

# **Flavonoide in Holunder- und Silberlindenblüten - Isolierung, Antioxidativität und Bioverfügbarkeit**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von   Stephanie Trebst  
aus   Stralsund

1. Referent:	apl. Professor Dr. Ulrich Engelhardt
2. Referent:	Professor Dr. Peter Winterhalter
eingereicht am:	25.06.2012
mündliche Prüfung (Disputation) am:	29.11.2013
Druckjahr 2014	

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Breiter, T.; Laue, C.; Kressel, G.; Gröll, S.; Engelhardt, U. H.; Hahn, A. (2011): Bioavailability and antioxidant potential of rooibos flavonoids in humans following the consumption of different rooibos formulations. *Food Chem.*, 128 (2), 338-347.

### **Tagungsbeiträge**

Gröll, S.; Laue, C.; Breiter, T.; Engelhardt, U. H. (2009): Bioavailability of flavonoids from flowers of black elder. EuroFoodChem XV, Kopenhagen/Dänemark. Abstract veröffentlicht in: *Proceedings of the Euro Food Chem XV*. Food for the future - the contribution of chemistry to improvement of food quality. Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Vol. II, 18-21.

Laue, C.; Gröll, S.; Breiter, T.; Engelhardt, U. H. (2009): Human study with flavonoids from green rooibos. EuroFoodChem XV, Kopenhagen/Dänemark. Abstract veröffentlicht in: *Proceedings of the Euro Food Chem XV*. Food for the future – the contribution of chemistry to improvement of food quality. Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Vol. II, 14-17.

Laue, C.; Gröll, S.; Breiter, T.; Engelhardt, U. H. (2010): Bioverfügbarkeit von Flavonoiden aus grünem Rooibos. 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Berlin 2009. Abstract veröffentlicht in: *Lebensmittelchemie*, 64, 121-122.

Laue, C.; Breiter, T.; Gröll, S.; Engelhardt, U. H.; Hahn, A. (2011): Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Rooibosflavonoiden *in vivo*. 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Stuttgart-Hohenheim 2010. Abstract veröffentlicht in: *Lebensmittelchemie*, 65, 96.

## Danksagung

Besonderen Dank möchte ich zu aller erst meinem Doktorvater Herrn apl. Prof. Dr. U.H. Engelhardt aussprechen. Seine Unterstützung und unkomplizierte Art der Betreuung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank für das in mich gesetzte Vertrauen und die Möglichkeit meine Ergebnisse international präsentieren zu können.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt Herrn Prof. Dr. P. Winterhalter, der mich mit seiner Fürsorge, Hilfsbereitschaft und seinem Verständnis während der gesamten Zeit begleitet und sehr unterstützt hat. Daneben danke ich ihm für die Übernahme des Zweitgutachtens und das Mitwirken in der Prüfungskommission. Herrn Prof. Dr. H. Wätzig danke ich ebenfalls für sein Mitwirken in der Prüfungskommission.

Der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AIF) und dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie (FEI) danke ich für die Finanzierung dieser Arbeit. Der Wirtschaftsvereinigung Kräuter- und Fruchtee e.V. (WKF), insbesondere Herrn Dr. Adolf Kler, danke ich für seine wissenschaftlichen Anregungen und die Bereitstellung des Probenmaterials.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. A. Hahn und Herrn Till Breiter von der Leibniz Universität Hannover für die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Herrn Dr. V. Wray vom Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung danke ich sehr für die Aufnahme der NMR-Spektren, die so wichtig für diese Arbeit waren.

Für die angenehme und freundschaftliche Atmosphäre danke ich meinen lieben Laborkollegen Frau Beate Maiwald, Frau Dr. Yumen Hilal, Herrn Dr. Christian Laue und Herrn Nils Kaiser.

Frau Katharina Bensack und Herrn Stephan Schoenfeldt danke ich für die tatkräftige Unterstützung dieser Arbeit im Rahmen der Durchführung ihrer Diplomarbeiten.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Frau Carola Balcke für das so gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit und die Hilfsbereitschaft, die sie mir immer entgegen gebracht hat.

Herrn Recep Gök und Herrn Andreas Juadjur danke ich für die Hilfestellung bei meinen PC-Problemen.

Ein besonders großer Dank gilt meinen Mitstreitern und Freunden Tuba, Yumen, Steffi, Miriam, Marcela und Sebastian, mit denen ich eine so schöne Zeit erleben durfte und die ich alle sehr lieb gewonnen habe.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt.

Nicht zuletzt möchte ich meinem lieben Mann Andreas danken, der mich in guten wie in schlechten Zeiten immer unterstützt hat und für mich mit seiner bedingungslosen Liebe ein Fels in der Brandung darstellt. Dir und unserer wunderbaren Tochter Victoria sei diese Arbeit gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Theoretische Grundlagen und Kenntnisstand.....	2
2.1	Allgemeines über Kräutertees.....	2
2.1.1	Definition.....	2
2.1.2	Historisches .....	3
2.1.3	Wirtschaftliche Bedeutung.....	3
2.2	Sekundäre Pflanzenstoffe.....	3
2.3	Polyphenole.....	3
2.3.1	Klassifizierung.....	3
2.3.1.1	Phenolische Säuren .....	4
2.3.1.2	Flavonoide .....	5
2.3.1.2.1	Flavonole .....	6
2.3.1.2.2	Flavanole und Proanthocyanidine.....	6
2.3.1.2.3	Anthocyanidine .....	8
2.3.1.2.4	Flavone .....	9
2.3.1.2.5	Isoflavone .....	9
2.3.1.2.6	Flavanone .....	9
2.3.2	Biosynthese von Polyphenolen .....	10
2.4	Bioverfügbarkeit von Polyphenolen.....	11
2.4.1	Allgemeines zum Fremdstoffmetabolismus.....	11
2.4.2	Bioverfügbarkeit von Flavonoiden, insbesondere von Quercetin bzw. Quercetinderivaten .....	12
2.4.3	Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Hydroxyzimtsäuren .....	15
2.5	Holunder ( <i>Sambucus nigra</i> L.) .....	16
2.5.1	Botanik.....	16
2.5.2	Inhaltsstoffe und Verwendung.....	16
2.6	Silberlinde ( <i>Tilia tomentosa</i> ) .....	17
2.6.1	Botanik.....	17
2.6.2	Inhaltsstoffe und Verwendung.....	18
2.7	Hopfen ( <i>Humulus lupulus</i> ).....	19
2.7.1	Botanik.....	19

2.7.2	Inhaltsstoffe und Verwendung .....	19
2.8	Ausgewählte angewandte Testsysteme und Methoden .....	20
2.8.1	Bestimmung der antioxidativen Aktivität des Pflanzenmaterials (TEAC-Assay) .....	20
2.8.2	Bestimmung der antioxidativen Aktivität des Blutplasmas (ORAC-Assay) .....	20
2.8.3	Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes (Folin-Ciocalteu-Test) .....	21
2.8.4	NMR-Spektroskopie .....	21
2.8.4.1	H,H-COSY-Experiment .....	21
2.8.4.2	HSQC-Experiment .....	22
2.8.4.3	HMBC-Experiment .....	22
2.8.4.4	NOESY- und ROESY-Experiment .....	22
2.8.5	Säurekatalysierte Degradation (Phloroglucinolyse) .....	22
2.9	Präparative Trenntechniken .....	24
2.9.1	Countercurrent Chromatography .....	24
2.9.1.1	Spiral-Coil LSRCCC .....	25
2.10	Zielsetzung .....	27
3	Ergebnisse und Diskussion .....	28
3.1	Übersichtsuntersuchungen der untersuchten Kräutertees .....	28
3.1.1	Extrahierbare Feststoffe .....	28
3.1.2	Antioxidativität und Gesamtphenolgehalt .....	28
3.2	Holunderblüten .....	30
3.2.1	Polyphenolprofil .....	30
3.2.2	Quantitative Bestimmungen .....	31
3.2.3	Isolierung von Verbindungen aus Holunderblüten .....	31
3.2.4	Untersuchungen zur Lagerstabilität eines Holunderblütengetränks .....	35
3.3	Studie zur Bioverfügbarkeit von Inhaltsstoffen aus Holunderblüten .....	37
3.3.1	Isolierung einer bioaktiven Fraktion zur Verabreichung an Probanden innerhalb der Humanstudie .....	37
3.3.2	Polyphenolprofil des verabreichten Teeaufgusses sowie der isolierten bioaktiven Fraktion im Vergleich .....	41
3.3.3	Humanstudie zur Bioverfügbarkeit von Polyphenolen aus Holunderblüten im Blutplasma .....	42
3.3.3.1	Studiendesign, Studienablauf und Abnahmezeitpunkte .....	42

3.3.3.2	Methodenoptimierung zur Aufarbeitung von Plasmaproben.....	42
3.3.3.3	Ergebnisse des Plasmascreenings .....	47
3.3.3.3.1	Plasmakonzentrationen von Chinasäure.....	47
3.3.3.3.2	Plasmakonzentrationen von Dihydroferulasäure .....	48
3.3.3.3.3	Plasmakonzentrationen Ferulasäure .....	49
3.3.3.3.4	Plasmakonzentrationen von Homovanillinsäure .....	50
3.3.3.3.5	Plasmakonzentrationen von Quercetinsulfat .....	52
3.3.3.3.6	Zusammenfassung des Plasmascreenings.....	54
3.3.4	Humanstudie zur Bioverfügbarkeit von Polyphenolen aus Holunderblüten im Urin ...	56
3.3.4.1	Auswahl der Methode zur Aufarbeitung von Urinproben .....	56
3.3.4.2	Ergebnisse des Urinscreenings .....	57
3.3.4.2.1	Urinkonzentrationen von Hippursäure .....	57
3.3.4.2.2	Urinkonzentrationen von Quercetinglucuronid.....	58
3.3.4.2.3	Urinkonzentrationen von Kämpferolglucuronid .....	60
3.3.4.2.4	Urinkonzentrationen von Homovanillinsäure .....	61
3.3.4.2.5	Urinkonzentrationen von Homovanillinsäuresulfat.....	62
3.3.4.2.6	Urinkonzentrationen von 5-Kaffeoylchinasäure .....	63
3.3.4.2.7	Urinkonzentrationen von 5-Feruloylchinasäure .....	64
3.3.4.2.8	Urinkonzentrationen von Ferulasäuresulfat .....	66
3.3.4.2.9	Zusammenfassung des Urinscreenings .....	66
3.3.5	Antioxidative Aktivitäten ausgewählter Metabolite im TEAC-Assay.....	67
3.4	Silberlindenblüten .....	69
3.4.1	Polyphenolprofil .....	69
3.4.2	Quantitative Bestimmungen .....	70
3.4.3	Isolierung bekannter sowie unbekannter Verbindungen aus Silberlindenblüten mittels HSCCC .....	71
3.4.3.1	Aufarbeitung eines Silberlindenblütenfeinschnitts mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion nach SCHOENFELDT (2010) .....	71
3.4.3.2	Antioxidative Aktivität der Phasen aus der Flüssig-Flüssig-Extraktion.....	72
3.4.3.3	HSCCC-Trennung eines Ethylacetatextraktes aus der ethanolischen Extraktion („Silb CCC-1“).....	72
3.4.3.4	Isolierung von Protocatechusäure und (-)-Epicatchin .....	75

3.4.3.5	HSCCC-Trennung eines Ethylacetatextraktes aus der methanolischen Extraktion... („Silb CCC-2“)	77
3.4.3.6	Isolierung von Quercetin-3-rhamnosid	79
3.4.4	Erstmaliger Einsatz der Spiral-Coil LSRCCC zur Isolierung bislang unbekannter Verbindungen aus Silberlindenblüten	80
3.4.4.1	Isolierung von Gallussäure	83
3.4.4.2	Isolierung von Kämpferol-3-glucosid und Quercetin-3-xylosid	84
3.4.4.3	Isolierung von Kämpferol-3-rhamnosid und Kämpferol-3-xylosid	85
3.4.4.4	Isolierung von 4-Hydroxybenzoesäure und Vanillinsäure	86
3.4.5	HSCCC-Trennung der Fraktion 1 aus der Spiral-Coil LSRCCC („Silb CCC-3“)	87
3.4.5.1	Isolierung von trimeren Procyanidinen	90
3.4.5.1.1	Isolierung und Strukturaufklärung des trimeren Procyanidins (-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin (C1)	90
3.4.5.1.2	Isolierung und Strukturaufklärung des trimeren Procyanidins (-)-Epicatechin-4 $\beta$ →6-(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin	95
3.4.5.1.3	Isolierung und Strukturaufklärung des trimeren Procyanidins (-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →6-(-)-Epicatechin	97
3.4.5.2	Isolierung und Strukturaufklärung eines tetrameren Proanthocyanidins (-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin	98
3.4.6	Antioxidative Aktivitäten von Inhaltsstoffen aus Silberlindenblüten	100
3.5	Hopfendolden	102
3.5.1	Polyphenolprofil	102
3.5.2	Quantitative Bestimmungen	103
4	Zusammenfassung	104
5	Experimenteller Teil	107
5.1	Material und Methoden	107
5.1.1	Pflanzenmaterial	107
5.1.2	Chemikalien	107
5.2	Geräteparameter	109
5.2.1	Photometer	109
5.2.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	109
5.2.2.1	Analytische Anlagen	109
5.2.2.2	Präparative Anlage	109



5.2.3	Massenspektrometer .....	110
5.2.4	Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	110
5.2.5	High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) .....	111
5.2.6	Spiral-Coil LSRCCC.....	111
5.2.7	Sonstige Geräte .....	111
5.2.8	Methoden.....	111
5.2.8.1	Standardmethoden .....	111
5.2.8.1.1	Haushaltsüblicher Teeaufguss.....	111
5.2.8.1.2	Methanolische Extraktion .....	111
5.2.8.1.3	Extrahierbare Feststoffe.....	112
5.2.8.1.4	Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes (Folin-Ciocalteu) .....	112
5.2.8.1.5	Bestimmung der antioxidativen Aktivität .....	113
5.2.8.1.6	Phloroglucinolyse .....	114
5.2.8.2	Analytische Methoden .....	114
5.2.8.2.1	Analytik der Holunderblüten.....	114
5.2.8.2.2	Analytik der Silberlindenblüten.....	114
5.2.8.2.3	Analytik der Hopfenzapfen.....	115
5.2.8.2.4	Berechnung der Gehalte der Flavonol-O-glykoside, Hydroxyzimtsäurederivate und Procyanidine.....	115
5.2.8.3	Präparative Methoden .....	117
5.2.8.3.1	Herstellung der Extrakte .....	117
5.2.8.3.2	Herstellung eines XAD-7 Extraktes.....	117
5.2.8.3.3	Isolierung mittels präparativer HPLC .....	118
5.3	Humanstudie (durchgeführt am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung / Leibniz Universität Hannover) .....	118
5.3.1	Studiendesign .....	118
5.3.2	Probenvorbereitung und Analytik der Plasmaproben .....	121
5.3.2.1	Plasmagewinnung.....	121
5.3.2.2	Aufarbeitung der Plasmaproben zur Analytik mittels HPLC-ESI-MS .....	121
5.3.2.3	LC-ESI-MS-Methode zur Bestimmung von Metaboliten bzw. unveränderten Verbindungen in Urin und Plasma.....	121
5.3.2.4	Wiederholpräzision und Vergleichspräzision .....	121
5.3.2.5	Kalibrierung und Quantifizierung der Metabolite im Plasma .....	122
5.3.2.6	Aufarbeitung der Urinproben zur Analyse mittels HPLC-ESI-MS .....	123

5.3.2.7	Wiederholpräzision und Vergleichspräzision .....	123
5.3.2.8	Kalibrierung und Quantifizierung der Metabolite im Urin .....	124
5.4	Physikalisch-chemische Charakterisierung der isolierten Verbindungen .....	126
6	Literaturverzeichnis .....	132
7	Anhang.....	140
7.1	HSCCC-Trennungen .....	140
7.1.1	Hol CCC-1 .....	140
7.1.2	Hol CCC-2 .....	140
7.1.3	Hol CCC-3 .....	140
7.1.4	Silb CCC-1.....	140
7.1.5	Silb CCC-2.....	141
7.1.6	Silb CCC-3.....	141
7.2	Spiral-Coil LSRCCC Trennung .....	141
7.2.1	Silb Spiral-Coil .....	141
7.3	Plasmascreening.....	142
7.3.1	Chinasäure.....	142
7.3.2	Dihydroferulasäure.....	142
7.3.3	Homovanillinsäure.....	142
7.3.4	Quercetinsulfat.....	142
7.3.5	Ferulasäure .....	143
7.4	Urinscreening .....	143
7.4.1	Hippursäure .....	143
7.4.2	Quercetinglucuronid.....	143
7.4.3	Kämpferolglucuronid .....	143
7.4.4	Homovanillinsäure.....	144
7.4.5	Homovanillinsäuresulfat.....	144
7.4.6	5-Kaffeoylchinasäure .....	144
7.4.7	5-Feruloylchinasäure .....	144

## Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)
Aceton-d <sub>6</sub>	deutერიertes Aceton
ACN	Acetonitril
c	Konzentration
C	(+)-Catechin
CCC	Countercurrent Chromatography
COSY	Correlated Spectroscopy
CQA	Kaffeoylchinasäure
C <sub>max</sub>	Maximalkonzentration
C <sub>min</sub>	Minimalkonzentration
C <sub>MW</sub>	Mittelwert der Konzentration
Ø C <sub>max</sub>	durchschnittliche Maximalkonzentration
δ	chemische Verschiebung in ppm (parts per million)
d	Dublett
DAD	Diodenarray-Detektor
dd	Dublett vom Dublett
DMF	Dimethylformamid
DMSO-d <sub>6</sub>	deutერიertes Dimethylsulfoxid
EC	(-)-Epicatechin
EC-Ph	(-)-Epicatechin-Phloroglucinol
ESI-MS	Electrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
EtOAc	Ethylacetat
g	Gramm
gal	Galaktose
glc	Glukose
h	Stunde
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSCCC	High-Speed Countercurrent Chromatography
J	Kopplungskonstante
K	Verteilungskoeffizient
kg	Kilogramm
LC	Liquid Chromatography
LSRCCC	Low-Speed Rotary Countercurrent Chromatography
M	Molare Masse
MeOH	Methanol
Methanol-d <sub>4</sub>	deutერიertes Methanol

MHz	Megahertz
[M-H] <sup>-</sup>	Pseudomolekülion im negativen Modus
[M+H] <sup>+</sup>	Pseudomolekülion im positiven Modus
min	Minute(n)
m/z	Verhältnis Masse/Ladung
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
n.n.	nicht nachweisbar
Nr.	Nummer
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
Pb	Proband
Ph	Phloroglucinol
Q	Quercetin
ROESY	Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy
RP	Reversed Phase
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
rut	Rutinose
SPE	Solid Phase Extraction
TEAC	Trolox <sup>®</sup> Equivalent Antioxidant Capacity
t <sub>max</sub>	Maximale Zeit in [h]
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TS	Trockensubstanz
TSS	extrahierbare Feststoffe
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

## 1 Einleitung

Kräuter- und Früchtetees besitzen im Volksmund ein positives Image als gesunde Getränke. Grund dafür ist der hohe Gehalt an polyphenolischen Inhaltsstoffen, da diesen unter anderem die Eigenschaft zugeschrieben wird, freie Radikale abzufangen und somit dem oxidativen Stress im menschlichen Körper entgegenzuwirken, woraus wiederum eine protektive Wirkung im Hinblick auf degenerative Erkrankungen resultiert. In den vergangenen Jahren konnte ein starker Anstieg des Interesses an solchen Verbindungen und Lebensmitteln, die diese enthalten, beobachtet werden. Mehr und mehr wird auf den Verpackungen von Lebensmitteln auf gesundheitlich positive Wirkungen mit Aussagen wie „schützt den Körper von innen“ oder „enthält Antioxidantien, die die Abwehrkräfte des Körpers stärken“ geworben. Nach der Health-Claim-Verordnung ist eine solche Werbung mit gesundheitlichen Wirkungen nur erlaubt, wenn diese Aussage „wissenschaftlich abgesichert ist“ und diese in einer Positivliste der EFSA (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit) aufgeführt ist. Nur etwa 220 Health-Claims schafften es bisher auf diese Liste erlaubter gesundheitsbezogener Angaben. Seitens der Hersteller ist es besonders wichtig, mögliche gesundheitliche Effekte auf dem Produkt auszuweisen, um somit der Wettbewerbsfähigkeit stand zu halten. Aufgrund der Komplexität der verwendeten Pflanzenteile in Kräuter- und Früchtetees stellt diese Regelung in diesem Bereich eine große Herausforderung dar. In diesem Zusammenhang wird unter anderem die Forschung auf diesem Gebiet weitestgehend mit einbezogen, um der Rechtsgrundlage gerecht zu werden und gesundheitsbezogene Aussagen wissenschaftlich zu bestätigen. Bislang gibt es nur wenige Daten über Konzentration und Bioverfügbarkeit von Inhaltsstoffen aus Kräuter- und Früchtetees und deren gesundheitliche Wirkungen.

## 2 Theoretische Grundlagen und Kenntnisstand

### 2.1 Allgemeines über Kräutertees

#### 2.1.1 Definition

Kräuter- und Früchtetees werden zwar im Sprachgebrauch als „Tee“ bezeichnet, sind aber laut Definition sogenannte „teeähnliche Erzeugnisse“. Unter teeähnlichen Erzeugnissen versteht man aromatische Getränke, die aus getrockneten Pflanzenteilen, z.B. Blättern (wie Orangen- oder Pfefferminzblättern), Früchten (wie Äpfeln oder Hagebutten) oder auch Blüten (wie Lindenblüten oder Kamillenblüten) hergestellt und mit kochendem Wasser aufgegossen werden.

Im Handel sind sowohl klassische Erzeugnisse aus einer einzigen Pflanzenart, wie z.B. Pfefferminztee oder Hagebuttentee, als auch Mischungen von verschiedenen Kräutern zu finden. Darüber hinaus ist eine Vielzahl an Mischungen erhältlich, die mit Aromen oder mit Vitaminen angereichert sind.

Im Volksmund besitzen Kräuter- und Früchtetees ein positives Image als gesunde Getränke. Diese Einschätzung ist jedoch meist nicht durch wissenschaftliche Untersuchungen belegt, sondern beruht vor allem auf empirischen Daten zum Zusammenhang zwischen Lebensmittelverzehr und gesundheitlichen Faktoren.

Aufgrund ihrer wohltuenden Wirkung sind Kräuter- und Früchteteeemischungen oftmals auch in Arzneimitteltees zu finden. Die meisten Arzneitees sind sogenannte „freiverkäufliche Arzneimittel“ und dürfen über den Lebensmitteleinzelhandel verkauft werden, einige wenige sind apothekenpflichtig (WIRTSCHAFTSVEREINIGUNG KRÄUTER- UND FRÜCHTETEE E.V., 2010).

Man unterscheidet zwei Produktgruppen:

1. Kräuter- und Früchtetees, die als Lebensmittel im Rahmen der Ernährung genossen werden.
2. Arzneitees, die unter das Arzneimittelgesetz fallen und auf den Verpackungen eine entsprechende Kennzeichnung sowie Wirkung und Gegenanzeigen aufweisen müssen.

Neuere Produkte mit Phantasienamen wie „Oase der Ruhe“, „Oase der Energie“ oder „Oase der Entspannung“ liefern eine große Vielfalt an verschiedenen Kräutertees, die viele verschiedene Inhaltsstoffe enthalten. Auch die innerhalb dieser Arbeit behandelten Holunderblüten, Silberlindenblüten sowie Hopfendolden finden in vielen Tees dieser Art Verwendung. Beispielsweise wird bei der Bezeichnung des Tees „Oase der Entspannung“ auf die beruhigende Wirkung des Hopfens angespielt.

### **2.1.2 Historisches**

Als Ursprungsland des Kräutertees gilt China. Die ersten Aufzeichnungen wurden um ca. 3000 v. Chr. aus dem Kräuterbuch des chinesischen Kaisers Sheng-Nung überliefert. In Ägypten entstand um etwa 1550 v. Chr. das Papyrus Ebers, das bereits über 700 verschiedene Rezepturen für die Zubereitung von Kräuter- und Früchtetees enthielt. In den Klöstern des Mittelalters erlangten Kräuter- und Früchtetees unter anderem auch in Deutschland eine große Bedeutung (WIRTSCHAFTSVEREINIGUNG KRÄUTER- UND FRÜCHTETEE E.V., 2010).

### **2.1.3 Wirtschaftliche Bedeutung**

Vielseitige Kräuter- und Früchtetees erfreuen sich einer großen Beliebtheit bei der deutschen Bevölkerung. 2010 erlangten Kräuter- und Früchtetee-Mischungen mit 17.120 verkauften Tonnen und einem Absatz-Plus von 5,6 % die besten Verkaufszahlen der letzten 5 Jahre in der Bundesrepublik, wie die aktuellen Marktdaten der Wirtschaftsvereinigung Kräuter- und Früchtetee e.V. (WKF) belegen. Monosorten wie Pfefferminze, Kamille, Fenchel und Rotbusch blieben mit 20.266 Tonnen (2009: 20.409 Tonnen) das beliebteste Segment. Das Verhältnis der Monosorten zu den Kräuter- und Früchtetee-Mischungen beträgt 54,2 % versus 45,8 % (WIRTSCHAFTSVEREINIGUNG KRÄUTER- UND FRÜCHTETEE E.V., 2010).

## **2.2 Sekundäre Pflanzenstoffe**

## **2.3 Polyphenole**

### **2.3.1 Klassifizierung**

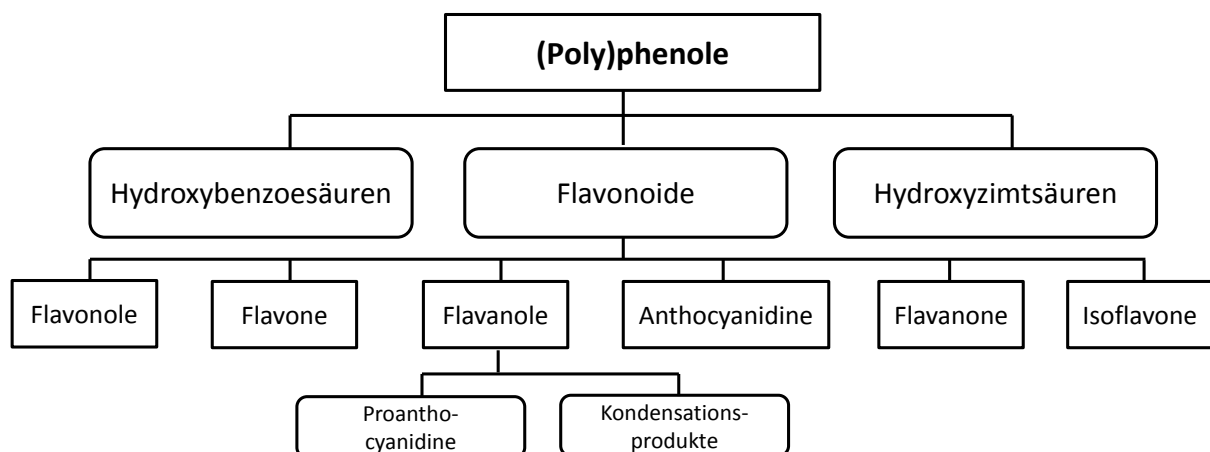
Polyphenole sind in Pflanzen weit verbreitete Inhaltsstoffe, die zu den sekundären Pflanzenstoffen gezählt werden, da sie nicht im Primärstoffwechsel, sondern im Sekundärstoffwechsel der Pflanze synthetisiert werden. Die gebildeten Produkte sind weder an den Biosynthesen beteiligt noch für das Überleben der Zellen bzw. der Pflanze notwendig. Die spezifischen Funktionen der Polyphenole in Pflanzen sind seit langem ein bedeutender Gegenstand der Forschung. Nach allgemeinem Kenntnisstand ist bekannt, dass diese Verbindungen von der Pflanze als Lockstoffe (Aroma, Duft und Farbe), zur Wachstumsregulation und als Abwehrstoffe gegen Umwelteinflüsse, Schädlinge oder Krankheitserreger synthetisiert werden.

Zahlreiche epidemiologische Studien weisen auf eine negative Korrelation zwischen der Flavonoidaufnahme und dem Risiko für verschiedenste Krankheiten hin. Beispielsweise liegt die Zahl an koronaren Herz- und Kreislauferkrankungen in Frankreich niedriger als in Großbritannien, den USA oder Deutschland, was auf den höheren Obst- und Gemüseverzehr sowie den Rotweinkonsum, also der höheren Aufnahme an Polyphenolen in Frankreich, zurückgeführt wird. Durch ihre Fähigkeit reaktive Sauerstoffspezies abfangen zu können, welche Kettenreaktionen initiieren und an Lipiden, Proteinen oder DNA Schäden verursachen, kommt es vermehrt zu einem verminderten Risiko von Arteriosklerose, Krebs, Rheuma oder Diabetes mellitus (BÖHM et al., 1998).

Der Begriff “Polyphenol” wird in der Literatur uneinheitlich verwendet und in älteren Veröffentlichungen meist als Sammelbezeichnung für Verbindungen mit mindestens zwei phenolischen Hydroxyl- oder Phenoethergruppen im Molekül charakterisiert. CLIFFORD (1999) limitierten den Begriff auf jene Verbindungen, die mindestens zwei aromatische Ringe besitzen, von denen jeder mindestens eine Hydroxylgruppe trägt. Demnach gehören nach heutiger Definition Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren wie beispielsweise Kaffee- oder Cumarsäure zu den “einfachen Phenolen” (oder auch “Phenolsäuren” genannt). Eine Untergruppe der phenolischen Verbindungen bilden die Flavonoide, welche in der Natur sehr weit verbreitet in vielen Obst- und Gemüsearten vorkommen. Aufgrund der verschiedenen Oxidationsstufen am heterocyclischen Ring werden Flavonoide in sechs Hauptgruppen eingeteilt: Flavonole, Flavone, Flavanole, Anthocyanidine, Flavanone und Isoflavone. Die Flavanole werden weiterhin noch in monomere Flavanole und in die aus mehreren Flavanol-Einheiten aufgebauten Proanthocyanidine und deren Kondensationsprodukte unterteilt.

Nach WATZL und RECHKEMMER (2001) tragen Phenolsäuren zu etwa einem Drittel zur Gesamtphenolaufnahme bei, Flavonoide hingegen zu etwa zwei Drittel.

In **Abbildung 1** ist eine Übersicht über die Einteilung von Phenolen dargestellt.



**Abbildung 1:** Klassifizierung der (Poly)phenole nach ENGELHARDT (1998)

### 2.3.1.1 Phenolische Säuren

Phenolische Säuren können in zwei Klassen unterteilt werden (**Abbildung 2**):

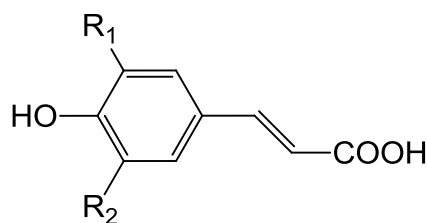
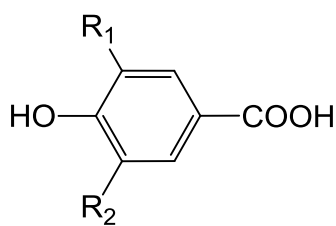
1. Hydroxybenzoesäuren und deren Derivate ( $C_6-C_1$ -Körper)
2. Hydroxyzimtsäuren und deren Derivate ( $C_6-C_3$ -Körper)

Hydroxybenzoesäuren kommen in nahezu allen Obst- und Gemüsesorten, Gewürzen und Cerealien vor, konnten aber auch in Tee nachgewiesen werden. Dort liegen sie vielfach in Form ihrer Ester und/oder Glykoside vor. Gallussäure ist der wichtigste Vertreter dieser Gruppe und kommt unter anderem in schwarzem Tee ( $\emptyset$  0,34 % i. Tr.) sowie in grünem Tee ( $\emptyset$  0,09 % i. Tr.) vor (LAPCZYNSKI, 2000). Die Gehalte an Hydroxyzimtsäuren sind im Vergleich zu den Hydroxybenzoesäuren in Pflanzen meist höher und in der Natur kommen sie in freier Form nur selten vor. Überwiegend liegen sie ebenfalls als Ester und Glykoside vor. Chinasäure, Shikimisäure und Weinsäure sind die wichtigsten



Säuren, die mit Hydroxyzimtsäuren meist verestert vorliegen. In Lebensmitteln liegt der Gehalt an Derivaten der Hydroxyzimtsäuren oft bei etwa 0,2 % bezogen auf die Trockensubstanz.

Eine Ausnahme ist die 5-Chlorogensäure, der am häufigsten vorkommende Hydroxyzimtsäureester, bestehend aus Chinasäure und Kaffeesäure. Er ist als einer der Hauptinhaltsstoffe des Kaffees bis zu 8 % darin enthalten. Aber auch in vielen Früchten, Getreide- und Gemüsearten konnten hohe Gehalte nachgewiesen werden (EISENBRAND und SCHREIER, 2006). Die Hydroxyzimtsäuren sorgen in den Schalen der Pflanzen für die Stabilität der Zellwände und befinden sich daher vermehrt in den äußeren Schichten. Wie auch MANACH et al. (2005) und FRANZKE (1996) erläuterten, führt beispielsweise das Schälen oder Zerkleinern von phenolsäurehaltigen Lebensmitteln vor dem Verzehr zu einer Reduzierung des Säuregehaltes.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>Hydroxybenzoesäure</b>		
p-Hydroxybenzoesäure	H	H
Protocatechusäure	OH	H
Gallussäure	OH	OH
Vanillinsäure	OCH <sub>3</sub>	H
<b>Hydroxyzimtsäure</b>		
p-Cumarsäure	H	H
Kaffeesäure	OH	H
Ferulasäure	OCH <sub>3</sub>	H
Sinapinsäure	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

**Abbildung 2:** Grundstruktur der Hydroxybenzoesäuren (links oben) und der Hydroxyzimtsäuren (links unten) sowie einige Beispiele (rechts)

### 2.3.1.2 Flavonoide

Bei den Flavonoiden handelt es sich um die größte Gruppe der Polyphenole. Alle Verbindungen haben das typische C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Grundgerüst gemeinsam (**Abbildung 3**). Der Name "Flavonoide" leitet sich aus dem lateinischen "flavus" (gelb) ab. Flavonoide sind Pigmente, die die Färbung vieler Blüten und Früchte hervorrufen. Früher dienten Flavonoid-Extrakte zum Färben von Wolle. Die Grundstruktur besteht aus drei Kohlenstoffringen mit zwei aromatischen (A und B) und einem O-heterozyklischen Ring (C). Alle Verbindungen der Flavonoide lassen sich strukturell vom Flavan (2-Phenyl-benzo-dihydropyran) ableiten. Basierend auf dem Oxidationsgrad des C-Ringes können sie in sechs verschiedene Untergruppen klassifiziert werden: Flavonole, Flavone, Flavanole, Anthocyanidine, Flavanone und Isoflavone (EISENBRAND und SCHREIER, 2006).

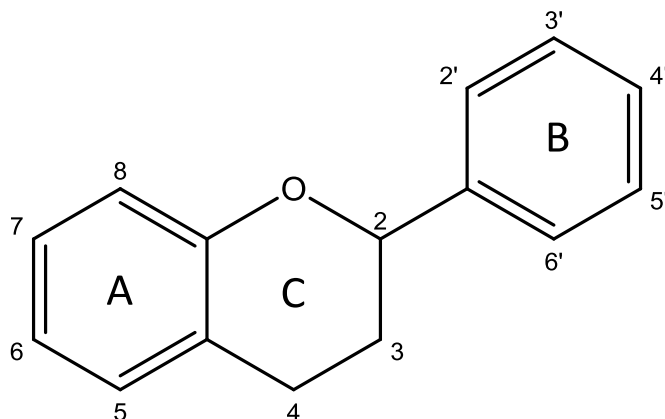
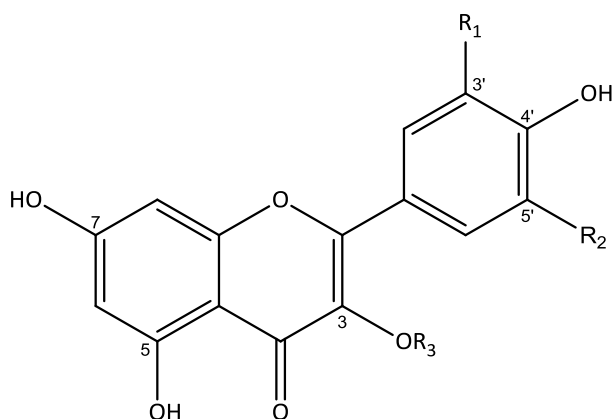


Abbildung 3: Flavan-Grundgerüst der Flavonoide

### 2.3.1.2.1 Flavonole

Die Gruppe der Flavonole (**Abbildung 4**) stellt unter den Flavonoiden die größte und verbreitetste Gruppe dar. In der Natur liegen diese eher selten als freie Hydroxyverbindungen oder als Methylether, sondern meist als wasserlösliche Glykoside vor. Sie sind als gelbe Farbstoffe in nahezu allen Gemüse- und Obstsorten zu finden. Hohe Konzentrationen der Aglykone treten in Blütenblättern, Rinden und Schalen auf, da die Biosynthese dieser phenolischen Verbindungen durch das Sonnenlicht in den äußeren Regionen der Pflanze stärker angeregt wird. Flavonole besitzen zusätzlich zu dem Flavan-Grundgerüst zwei bis sechs Hydroxylgruppen, meistens in den Stellungen 2, 5, 7, 3', 4' oder 5'. Bei den Flavonolglykosiden sind die Zuckerreste in der Regel an den Positionen 3, 5 oder 7 verknüpft. Wichtige Vertreter sind Kämpferol (5,7,4'-Trihydroxyflavonol) und Quercetin (5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavonol) (MANACH et al., 2004).



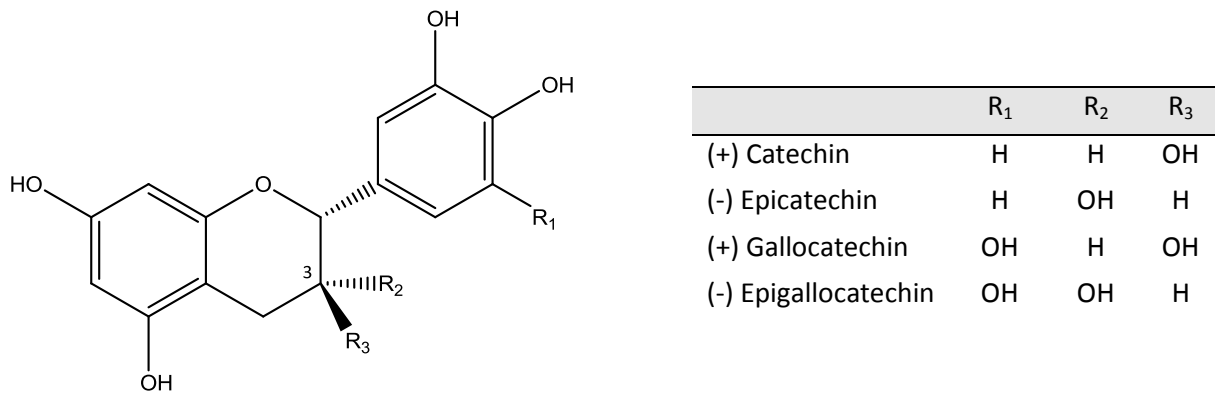
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Kämpferol	H	H	H
Quercetin	OH	H	H
Myricetin	OH	OH	H
Isorhamnetin	OCH <sub>3</sub>	H	H
Astragalin	H	H	glc
Rutin	OH	H	rut
Isoquercitrin	OH	H	glc
Hyperosid	OH	H	gal

Abbildung 4: Grundstruktur der Flavonole sowie einige Beispiele der Aglykone und Flavonolglykoside

### 2.3.1.2.2 Flavonole und Proanthocyanidine

Eine weitere Klasse der Flavonoide stellen die farblosen Flavanole, auch Catechine genannt, dar (**Abbildung 5**). In der Natur kommen sie frei oder als Gallussäureester vor. Neben den monomeren Flavanolen Catechin, Epicatechin, Gallocatechin oder Epigallocatechin sind auch die oligomeren und polymeren Gerbstoffe, welche auch Proanthocyanidine genannt werden, von besonderer Bedeutung. Monomere Flavanole sind in Tee, Kakao, Früchten und daraus hergestellten Getränken enthalten.

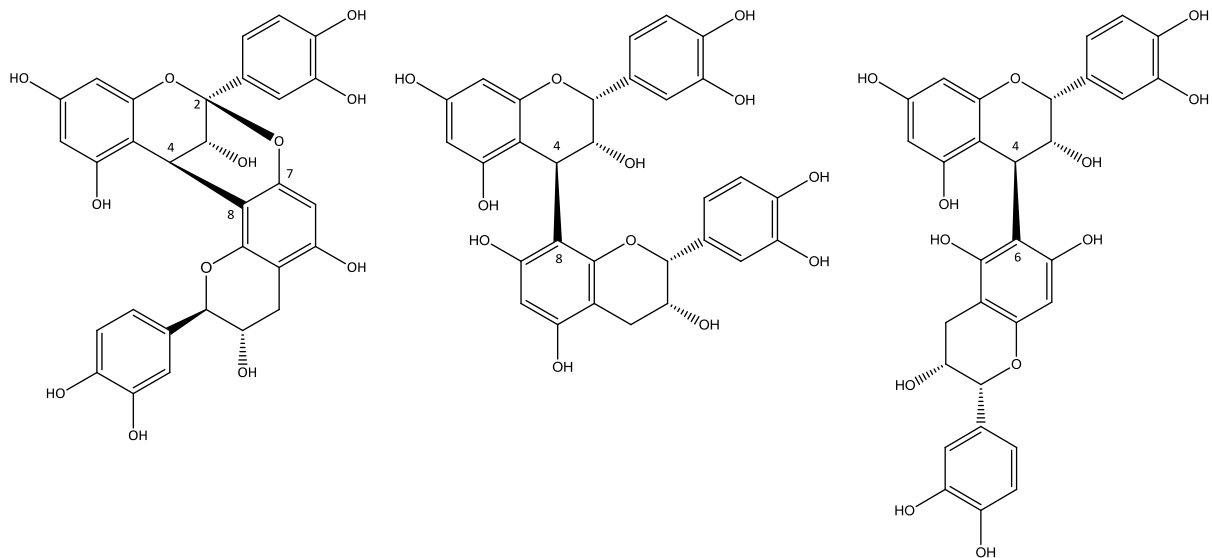
Die höchsten Konzentrationen konnten in grünem Tee und in Schokolade nachgewiesen werden (ARTS et al., 2000a; ARTS et al., 2000b; MANACH et al., 2004; HILAL, 2010). Catechine leisten außerdem einen großen Beitrag zum bitteren und adstringierenden Geschmack von grünem Tee (YAMANISHI, 1990).



**Abbildung 5:** Grundstruktur der Flavan-3-ole und einige Beispiele

Proanthocyanidine, die auch als kondensierte Tannine bezeichnet werden, besitzen einen bitteren Geschmack und sind hauptsächlich in Tee, Kakao, Nüssen, Gemüsepflanzen, Früchten und daraus hergestellten Getränken enthalten. Ihr Name leitet sich von ihrer Eigenschaft ab, unter Einwirkung von Säure zu den farbigen Anthocyanidinen umgewandelt zu werden (EISENBRAND und SCHREIER, 2006).

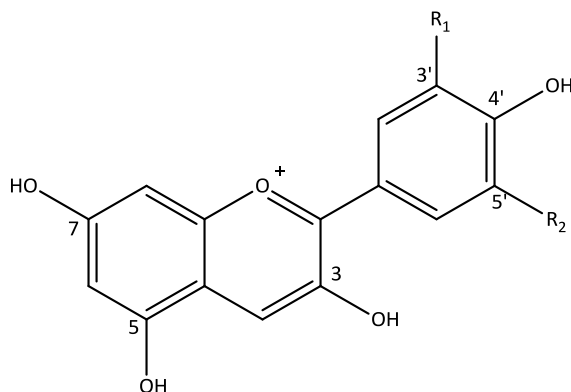
Proanthocyanidine werden in Procyanidine und Prodelphinidine unterteilt. Procyanidine bestehen aus den monomeren Bausteinen (+)-Catechin und (-)-Epicatechin (**Abbildung 6**). Bei den Prodelphinidinen liegen zusätzlich die monomeren Einheiten (-)-Gallocatechin und/ oder (-)-Epigallocatechin im Molekül vor. Die Art der Interflavanverknüpfung ist die Basis zur Differenzierung der A- und B-Typen der Proanthocyanidine. Während bei den A-Typen neben der interflavanoiden Bindung (4→8 oder 4→6) noch eine zusätzliche Etherbrückenbindung (7 O → 2) zwischen dem Kohlenstoffatom 2 des oberen Flavan-3-ols und dem Sauerstoff in Position 7 der Untereinheit vorhanden ist, sind B-Typen nur durch die interflavanoiden Bindungen (4→6 oder 4→8) miteinander verknüpft. Die Procyanidine vom Typ B kommen in der Natur häufiger vor als die des A-Typs (GU et al., 2003).



**Abbildung 6:** Strukturbeispiele verschiedener Procyanidine Dimer des A-Typs (links), Dimer des B-Typs (4→8 verknüpft) (mittig), Dimer des B-Typs (4→6 verknüpft) (rechts)

### 2.3.1.2.3 Anthocyanidine

Anthocyanidine (Polyhydroxyflavyliumsalze) sind natürliche, wasserlösliche Farbpigmente, die in der Natur hauptsächlich als 3-O-Glykoside vorkommen. Sie treten vorwiegend in den Farben rot, violett, blau oder blauschwarz auf. Anthocyane sind für die charakteristische Farbe der Früchte von Obst- und Gemüsearten sowie Blütenblättern verantwortlich. Daher befinden sich die höchsten Gehalte in den äußeren Zellschichten der Pflanzen, wie beispielsweise in Heidelbeeren. Im farbigen Fruchtfleisch können, wie beispielsweise in Erd- oder Aroniabeeren, ebenfalls hohe Konzentrationen auftreten. Der wesentliche Unterschied von Anthocyanidinen (**Abbildung 7**) zu den anderen Flavonoiden besteht in dem kationischen Sauerstoffatom im Pyran-Ring, der meistens als Gegenion ein Chloridanion aufweist (MAZZA und MINIATI, 1993). Nach dem heutigen Stand sind bisher ca. 250 Anthocyane bekannt, wovon Cyanidin, Delphinidin und Pelargonidin zu den am häufigsten vorkommenden Anthocyanidinen zählen (EISENBRAND und SCHREIER, 2006).

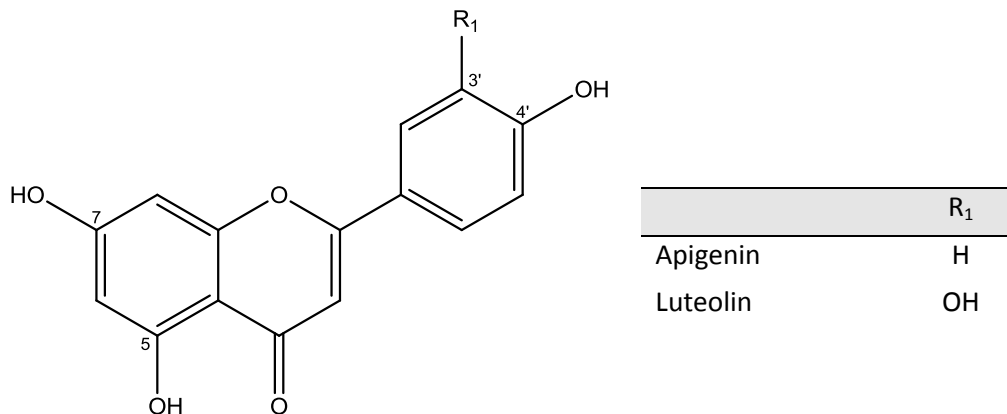


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Cyanidin	OH	H
Delphinidin	OH	OH
Pelargonidin	H	H
Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Peonidin	OCH <sub>3</sub>	H
Petunidin	OH	OCH <sub>3</sub>

**Abbildung 7:** Grundstruktur der Anthocyanidine und einige Beispiele

#### 2.3.1.2.4 Flavone

Flavone stellen neben den Flavonolen die zweitgrößte Gruppe der Flavonoide dar, sind aber in Obst- und Gemüsearten weniger verbreitet. Die höchsten Gehalte wurden in Petersilie, Sellerie und Paprika beschrieben. Flavone liegen in der Natur meist in glykosidisch gebundener Form vor. Zu den bekanntesten Flavonen zählen Apigenin (5, 7, 4'-Trihydroxyflavon) und Luteolin (5, 7, 3', 4'-Tetrahydroxyflavon) (**Abbildung 8**), die in der Pharmaindustrie als Spasmolytikum bzw. Antihämorrhagikum eingesetzt werden (MANACH et al., 2004).



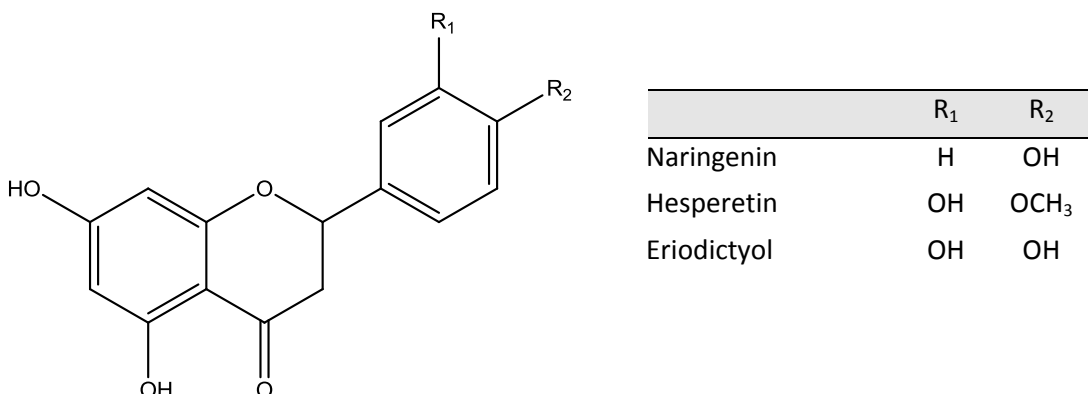
**Abbildung 8:** Grundstruktur der zwei bekanntesten Flavone

#### 2.3.1.2.5 Isoflavone

Die Gruppe der Isoflavone stellt eine Sondergruppe dar. Durch Beobachtungen in Tierversuchen konnten östrogene Wirkungsweisen festgestellt werden. Hieraus ergibt sich eine Zuordnung der Isoflavone zu den Phytoöstrogenen. In Kleearten und Sojabohnen treten diese Verbindungen vermehrt auf. Daidzein und Genistein zählen zu den bekanntesten Isoflavonen (MANACH et al., 2004) (**Abbildung 10**).

#### 2.3.1.2.6 Flavanone

Flavanone (**Abbildung 9**) kommen in der Natur eher selten vor. Die höchsten Gehalte sind in Citrusfrüchten zu finden, insbesondere Naringenin (5,7,4'-Trihydroxyflavanon) in Grapefruit und Hesperetin (5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxyflavanon) in Orangen. Diese sind hauptsächlich in glykosidisch gebundener Form Bestandteil des Fruchtfleisches und des Perikarps (MANACH et al., 2004).



**Abbildung 9:** Grundstruktur der Flavanone und einige Beispiele

### 2.3.2 Biosynthese von Polyphenolen

In der Literatur wurde die Biosynthese von polyphenolischen Verbindungen mehrfach beschrieben (MACHEIX et al., 1990). Die Biosynthese beginnt mit einer Reaktion zwischen den Precursoren Phosphoenolpyruvat und Erythrose-Phosphat, die aus dem Kohlenhydratstoffwechsel stammen. In den darauffolgenden Schritten entsteht Shikimisäure. Nach mehreren Zwischenstufen entstehen daraus die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin. Während ein Teil davon für den Proteinaufbau der Pflanze verwendet wird, wird der andere Teil über die Bildung von Zimtsäure zur p-Cumarsäure umgesetzt, die wiederum durch weitere Hydroxylierungs- und Methylierungsreaktionen zu Kaffeesäure und Ferulasäure umgewandelt werden kann. Hydroxyzimtsäurederivate können außerdem über die Bildung von Gallussäure auch direkt aus der Shikimisäure entstehen. Durch die Reaktion der an Coenzym A gebundenen p-Cumarsäure mit drei Malonyl-CoA-Einheiten unter katalytischer Einwirkung der Chalkon-Synthase wird die Bildung der vielfältigen Flavonoide eingeleitet und es entsteht das 4,2',4',6'-Tetrahydrochalkon, welches bereits das typische C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Grundgerüst aufweist. Der Ringschluss zum Flavanon findet nachfolgend durch die Chalcon-Isomerase statt. Aus diesem Ausgangsprodukt werden auf vielen verschiedenen Reaktionswegen die unterschiedlichen Flavonoide gebildet. Eine Übersicht über wichtige Reaktionsschritte der Biosynthese gibt **Abbildung 10**.

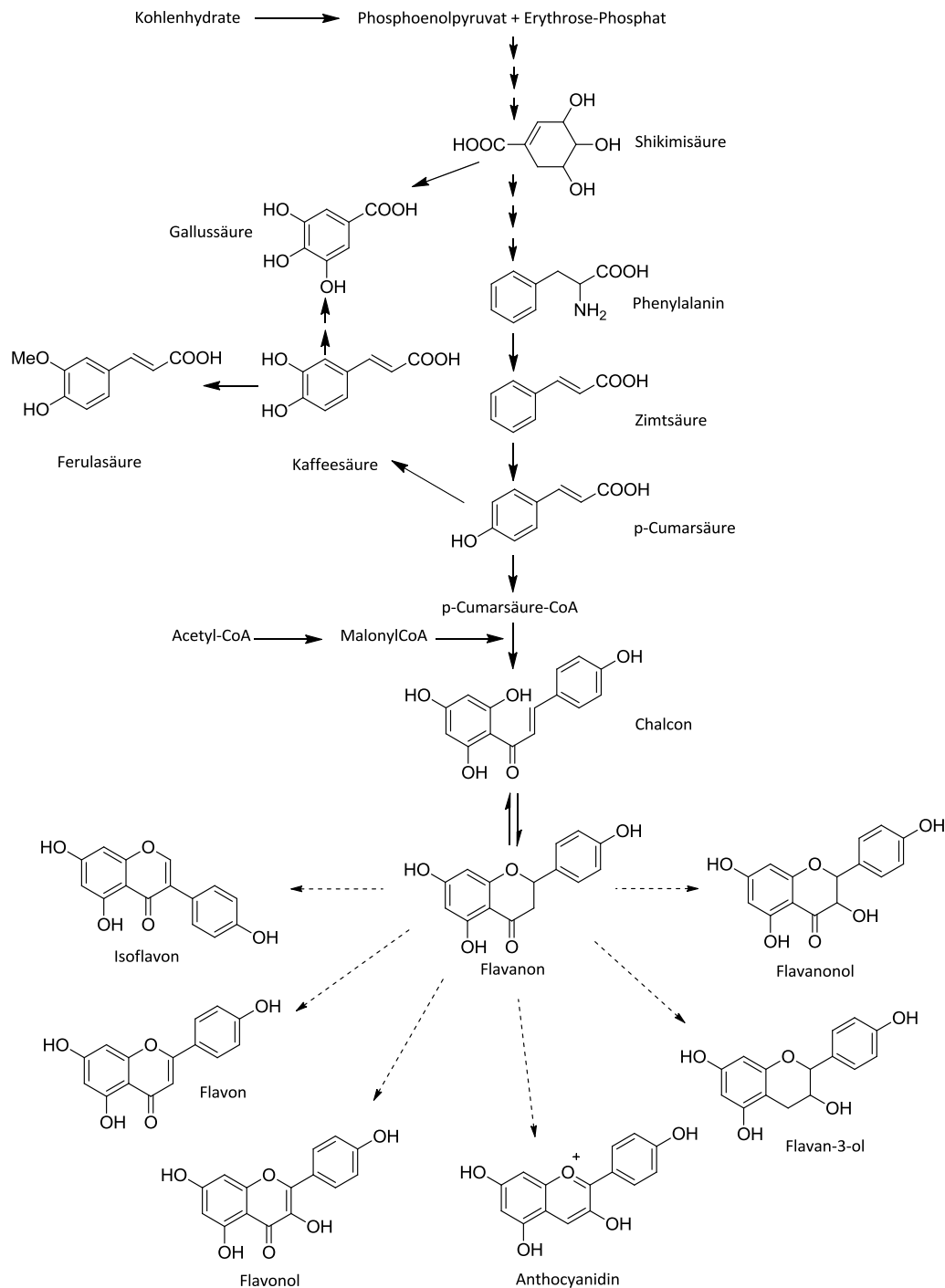


Abbildung 10: Biosynthese der Polyphenole nach MACHEIX et al. (1990)

## 2.4 Bioverfügbarkeit von Polyphenolen

### 2.4.1 Allgemeines zum Fremdstoffmetabolismus

Höhermolekulare Lebensmittelinhaltsstoffe können nicht in der zugeführten Form vom Organismus aufgenommen werden, da es sich um schwer wasserlösliche Verbindungen handelt. Aus diesem Grund unterliegen sie im Körper an verschiedenen Stellen biochemischen Um- und Abbauprozessen. Unter anderem werden die hochmolekularen Verbindungen durch hydrolytische Spaltung in ihre monomeren Bausteine zerlegt. Sie erfolgt durch die in den verschiedenen Verdauungssäften des

Magen-Darm-Traktes enthaltenen Enzyme. Im Gastrointestinaltrakt ist neben der hydrolytischen Spaltung die Konjugation der Hydroxylgruppen mit Glucuronsäure, Sulfat und/oder Glycin der häufigste Schritt der Metabolisierung von Polyphenolen. Auch in der Dünndarmmukosa und der Leber können die phenolischen Substanzen methyliert, sulfatiert und glucuronidiert werden. Die metabolisierten Bausteine werden von den Zellen der Dünndarmmukosa absorbiert und gelangen so in die Blutbahn bzw. das Lymphsystem, von wo aus sie über den gesamten Organismus verteilt werden. Der Fremdstoffmetabolismus findet dabei vor allem in der Leber, aber auch in Darm und weniger in der Niere statt. Ziel des Metabolismus ist die Verbesserung der Ausscheidung aus dem Körper. Hauptausscheidungswege sind die renale und biliäre Exkretion. Polare Moleküle mit einem Molekulargewicht < 300-500 D werden zumeist über die Niere ausgeschieden, größere Substanzen mit einem Molekulargewicht von > 300-500 D und einer polaren Gruppe bevorzugt über die Galle. Daher kann es im Dünndarm - teilweise auch erst nach Dekonjugation der Phase-II-Metaboliten - zu einer Rückresorption dieser Verbindungen kommen. Dieser sogenannte enterohepatische Kreislauf vermindert die Wirkung einer Fremdschubstanz, da ein erheblicher Teil der Dosis im Kreislauf gefangen sein und somit seine Wirkung nicht entfaltet werden kann.

Die zur Metabolisierung wichtigen Konjugationen finden enzymatisch statt und sind von der Verteilung und Spezifität der Enzyme abhängig (SCALBERT und WILLIAMSON, 2000). Beispielsweise kann durch Cytochrom-P450 Enzyme eine Methylierung vom Quercetin zum Isorhamnetin stattfinden (NIELSEN et al., 2002). Auch für Kaffeesäure wurde bereits nachgewiesen, dass diese zu Ferulasäure methyliert wird (MORIDANI et al., 2002). MANACH et al. (2004) beobachteten eine bevorzugte Methylierung des Quercetins an Position 3 des Catechol-Ringes. Hingegen wird die Glucuronidierung von phenolischen Substanzen vorrangig durch Enzyme der Familie UGT1A katalysiert, welche im Darm, in der Leber und in den Nieren zu finden sind (OLIVEIRA et al., 2002). Höchste Aktivitäten dieser Enzyme wurden bislang in der Dünndarmmukosa beschrieben. So wurde für Kaffeesäure gezeigt, dass eine Glucuronidierung hauptsächlich in der Dünndarmwand und nicht in der Leber stattfindet (SPENCER et al., 1999). Je nach Nahrung, Umwelteinflüssen und genetischen Faktoren können interindividuelle Unterschiede im Glucuronidierungsmuster auftreten (SCALBERT und WILLIAMSON, 2000). Die Konjugationen mit Sulfaten innerhalb des Metabolismus werden über Sulfotransferasen katalysiert, deren Aktivität in der Leber am höchsten ist.

Durch die hohe Kapazität der Konjugation konnten unter anderem MANACH et al. (2004) nachweisen, dass keine freien Polyphenolaglykone (mit Ausnahme der Teecatechine) im Plasma nachweisbar sind.

#### **2.4.2 Bioverfügbarkeit von Flavonoiden, insbesondere von Quercetin bzw. Quercetinderivaten**

Insbesondere die Bioverfügbarkeit des Flavonols Quercetin wurde in vergangenen Studien eingehend untersucht, da Quercetin und seine Glykoside in der Pflanzenwelt weit verbreitet sind. Hinsichtlich der Bioverfügbarkeit und Metabolisierung von Flavonolen gibt es in der Literatur viele kontroverse Veröffentlichungen. Bei einer der ersten Studien von vor etwa 35 Jahren, konnten GUGLER et al. (1975) nach Verabreichung von 4 g Quercetin weder im Blutplasma noch im Urin das intakte Flavonol oder Konjugate detektieren und schlossen daraus auf eine maximale Absorption von < 1 %. Im



Gegensatz dazu kommt eine spätere Studie von HOLLMAN et al. (1995) zu dem Ergebnis, dass nach oraler Aufnahme von gedünsteten Zwiebeln, die verschiedene Quercetinglykoside enthalten, bis zu 50 % der applizierten Dosis resorbiert werden können. Dabei konnten Metabolite wie Quercetin-3-O-glucuronid, 3-O-Methylquercetin-3-O-glucuronid sowie Quercetin-3-O-sulfat im Serum identifiziert werden. Lediglich in einer einzigen Studie gelang der Nachweis eines unveränderten Quercetin-3-glucosids (MULLEN et al., 2004). Einschlägig bekannt ist weiterhin, dass während des Metabolismus im Körper phenolische Säuren, wie 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylelessigsäure und 3-Hydroxyphenylelessigsäure aus Flavonolen gebildet werden (OLTHOF et al., 2003). OLTHOF et al. (2003) detektierten einen Großteil von appliziertem Rutin in Form von phenolischen Säuren im Urin der Probanden.

BOYLE et al. (2000) stellten bei einer weiteren Humanstudie fest, dass sowohl die langfristige orale Applikation von Rutin, als auch die Gabe einer Einzeldosis, zu einem Übergang von Rutinmetaboliten in das Plasma führten. Dieser fiel jedoch bei beiden Vorgehensweisen sehr gering aus und war mit keiner Zunahme der antioxidativen Kapazität assoziiert.

Bei einigen Studien wurde nach etwa 12-24 Stunden ein zweiter Plasmapeak detektiert (MOON et al., 2000; BOYLE et al., 2000). Dies ist anhand des sogenannten enterohepatischen Kreislaufs zu erklären, in welchem die teilweise von der Leber über die Galle ausgeschiedenen Polyphenolmetabolite im Dünndarm partiell reabsorbiert werden, sodass ein erheblicher Teil der applizierten Dosis im Kreislauf gefangen sein kann.

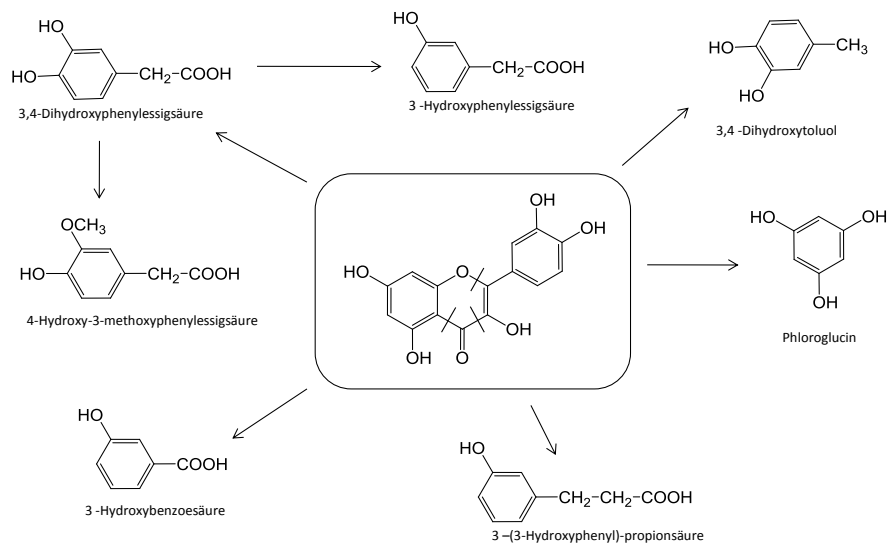
Die nicht im Dünndarm absorbierten bzw. über den enterohepatischen Kreislauf resezernierten Polyphenole und deren Metabolite gelangen in den Dickdarm, wo sie durch die Mikroflora verstoffwechselt werden (SCALBERT und WILLIAMSON, 2000; RECHNER et al., 2001). Die dort befindlichen Enzyme können eine Vielzahl von Reaktionen wie die Hydrolyse, Dehydroxylierungen, Demethylierungen, Reduktion von Doppelbindungen, Ringspaltungen sowie Decarboxylierungen katalysieren.

Ringspaltungen sind abhängig von der Art des Hydroxylierungsmusters der jeweiligen Polyphenolstruktur. Flavonole werden zu Phenylelessigsäuren und Phenylpropionsäuren abgebaut, wohingegen eine Spaltung der Flavan-3-ole zur Bildung von Phenylvalerolactonen und Phenylpropionsäuren führt (MANACH et al., 2004). Die entstehenden Phenolsäuren werden dann absorbiert oder weiter zu kurzkettigen Fettsäuren und/oder Kohlendioxid abgebaut. So fanden WALLE et al. (2001) nach Applikation von radioaktiv markiertem Quercetin zwischen 24 und 81 % der applizierten Dosis als Kohlendioxid in der Atemluft der Probanden wieder.

Vergangene in-vitro und in-vivo Versuche haben gezeigt, dass die konjugierten Flavonoidaglykone im Plasma an Albumin gebunden transportiert werden (MANACH et al., 2004). Infolge solcher Komplexbildungen ist die Entfaltung möglicher biologischer Effekte fragwürdig (DANGLES et al., 2001). BOULTON et al. (1998) konnten nach Durchführung von in-vitro-Versuchen belegen, dass die Flavonoid-Albumin-Komplexe im Vergleich zu den freien Flavonoiden eine deutlich geringere Erythrozytengängigkeit aufwiesen.

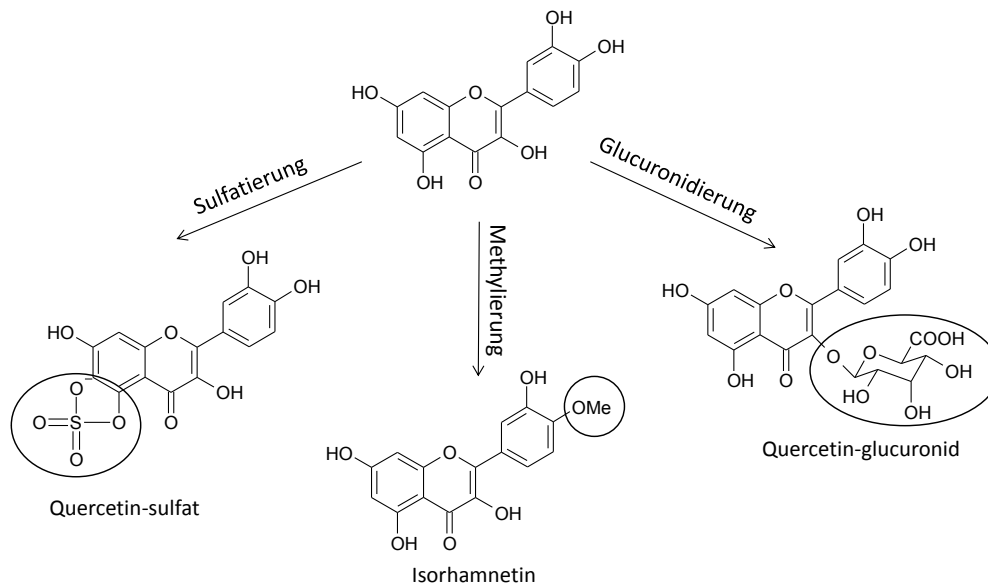
Generell kann gesagt werden, dass weniger als 10 % der aufgenommenen Flavonoide und Phenolcarbonsäuren oder ihre Metabolite im Plasma wiedergefunden werden. Deren Konzentrationen erreichen nur selten 1 µmol/L (SCALBERT und WILLIAMSON, 2000).

Allgemein unterscheidet man zwischen 2 Phasen des Fremdstoffmetabolismus: Zu den Phase-I-Reaktionen (Funktionalisierung) gehören beispielsweise Oxidations-, Reduktions-, sowie hydrolytische Reaktionen. Um einen Überblick über mögliche Phase-I-Metabolite des Quercetins zu erhalten, gibt **Abbildung 11** einige Beispiele dieser Metabolite.



**Abbildung 11:** Mögliche Phase-I-Metabolite des Quercetins

Phase-II-Reaktionen (Hydrophilisierung) hingegen sind beispielsweise Glucuronsäure- und/oder Aminosäure-Konjugationen, Sulfatierungen und Acetylierungen, die vorwiegend in der Leber stattfinden. In **Abbildung 12** sind mögliche Phase-II-Metabolite des Quercetins dargestellt.



**Abbildung 12:** Mögliche Phase-II-Metabolite des Quercetins

### 2.4.3 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Hydroxyzimtsäuren

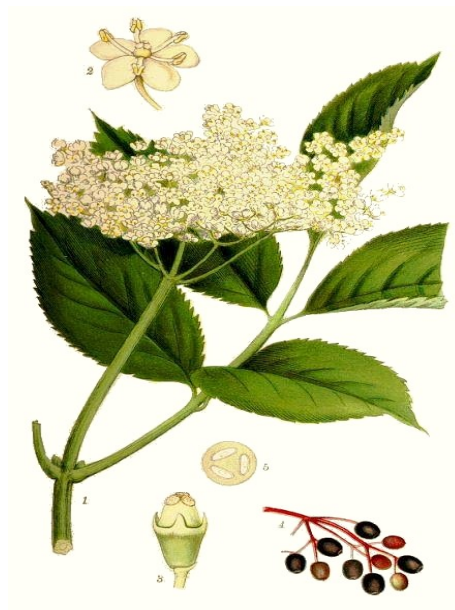
Im Rahmen bisheriger Studien konnte die Absorption veresterter Hydroxyzimtsäuren nicht eindeutig geklärt werden. Nach Applikation von 5-Kaffeoylchinasäure konnte die intakte Verbindung in geringen Mengen in Plasma und Urin detektiert werden. Da die Wiederfindung jedoch sehr gering war, schlossen CREMIN et al. (2001) auf eine Metabolisierung unter Spaltung der Esterbindung. So detektierten AZUMA et al. (2000) im Plasma keine 5-Kaffeoylchinasäure, sondern Kaffeesäure und deren Konjugate. Aufgrund des in Kaffee enthaltenen hohen Anteils an Hydroxyzimtsäuren, insbesondere von Kaffeoylchinasäuren, wurde deren Bioverfügbarkeit in der Vergangenheit zumeist anhand der Verabreichung von Kaffee untersucht. So identifizierten MONTEIRO et al. (2007) im Plasma nach der Gabe von Kaffee ebenfalls Kaffeesäure, aber auch geringe Mengen an unveränderter Kaffeoylchinasäure sowie di-Kaffeoylchinasäure. Im Urin hingegen konnten Dihydrokaffeesäure und Gallussäure als Hauptmetabolite charakterisiert und weiterhin viele verschiedene Hydrolyseprodukte wie Ferula-, Vanillin-, Kaffee-, Sinapin- und Hydroxybenzoesäure identifiziert werden. RECHNER et al. (2001) konnten neben den genannten Hydrolyseprodukten auch Isoferula-, Dihydroferula-, Hippur- und 3-Hydroxyhippursäure nach mehrmaligem Kaffeekonsum im Urin nachweisen. STALMACH et al. (2009) beschrieben, dass etwa eine halbe Stunde nach Kaffeegabe Metabolite wie Kaffeesäure- und Ferulasäuresulfat im Plasma detektiert werden konnten. Nach etwa 4 Stunden konnten Dihydroferulasäure, Dihydroferulasäuresulfat sowie Dihydrokaffeesäuresulfat identifiziert werden. Viele dieser Metabolite konnten ebenfalls im Plasma identifiziert werden. OLTROF et al. (2003) beschrieben weiterhin, dass etwa 50 % der verabreichten Chlorogensäuren zu Hippursäure metabolisiert werden.

## 2.5 Holunder (*Sambucus nigra* L.)

### 2.5.1 Botanik

Klasse:	Dreifurchenpollen – Zweikeimblättrige (Rosopsida)
Unterklasse:	Asternähnliche (Asteridae)
Ordnung:	Kardenartige (Dipsacales)
Familie:	Moschuskrautgewächse (Adoxaceae)
Gattung:	Holunder ( <i>Sambucus</i> )
Art:	Schwarzer Holunder

Der Holunder ist ein flachwurzelnder, bis zu 6 m hoher baumartiger Strauch mit unpaarig gefiederten Blättern, weißen Blüten und schwarzviolett glänzenden Beeren (**Abbildung 13**). In fast ganz Europa und Mittelasien ist der Holunderstrauch heimisch. Die bis zu 15 cm breiten flachschirmförmigen Trugdolden werden zu Beginn der Blüte (Juni-Juli) gesammelt, bei 30°C rasch getrocknet und schließlich von den Blütenstielen getrennt (gerebelte Droge). Holunderblüten schmecken schleimig süß, später aber kratzend (EISENBRAND und SCHREIER, 2006).



**Abbildung 13:** *Sambucus Nigra* L. (LINDMANN, 1926)

### 2.5.2 Inhaltsstoffe und Verwendung

Die Blüten enthalten hauptsächlich das Flavonol-O-glykosid Rutin (ca. 1,5 %), weiterhin Quercetin, Kaffee-, Chlorogen- und Ferulasäure bzw. deren Glykoside sowie Sambucin als farbgebenden Inhaltsstoff, daneben auch etherische Öle, Gerb- und Schleimstoffe sowie ein cyanogenes Glycosid (Sambunigrin) (WHO, 2002).

In der Volksheilkunde ist der Holunder tief verwurzelt. Sämtliche Pflanzenteile der in Mitteleuropa heimischen Holunderart wurden seit jeher traditionell eingesetzt. Heute werden die Blüten des Schwarzen Holunders (*Sambucus nigra*) hauptsächlich in Form von Tee, Sirup und Likören verzehrt. Ähnlich den Lindenblüten werden sie als Erkältungstee aufgrund ihrer schweisstreibenden und

blutreinigenden Wirkung angewendet. Weiterhin geben sie Lebensmitteln (wie z.B. in Ausbackteig) ein besonderes Aroma. Auch bei Schwellungen und Entzündungen werden Aufgüsse der getrockneten Blüten äußerlich angewandt, wobei zu beachten ist, dass frische Blüten Reizungen auf der Haut hervorrufen können (BOLLI, 2003).

## 2.6 Silberlinde (*Tilia tomentosa*)

### 2.6.1 Botanik

Klasse:	Dreifurchenpollen-Zweikeimblättrige (Rosopsida)
Unterklasse:	Rosenähnliche (Rosidae)
Ordnung:	Malvenartige (Malvales)
Familie:	Lindengewächse (Tiliaceae)
Unterfamilie:	Lindengewächse (Tilioideae)
Gattung:	Linden ( <i>Tilia</i> )

Die Silberlinde ist ein bis zu 35 m hoher, großen Schatten spendender, schnell wachsender und bodenverbessernder Waldbaum Südosteuropas, welcher durch den pyramidalen Wuchs und seine silbrig-grünen Blätter charakterisiert ist.

Die Blätter der Silberlinde sind breit-eiförmig bis rundlich und etwa 5 bis 7 cm groß. Die Basis der Blattspreite ist zum Stiel hin herzförmig oder schräg abgeschnitten. Das junge Blattwerk ist auf beiden Seiten mit Sternhaaren bedeckt, die mit der Zeit an der Oberseite ausfallen. Somit erhalten die Blätter die charakteristische silbergrau-grüne Farbe (**Abbildung 14**).

Die 7 bis 8 mm kleinen, lang gestielten, gelblichen und intensiv riechenden Zwitterblüten stehen zu fünft bis zehnt im Blütenstand. Blütezeit ist zwischen Ende Juni und Anfang Juli. Getrocknete Silberlindenblüten schmecken leicht süß, schleimig und angenehm, was von dem Zusammenspiel adstringierender Gerbstoffe mit Schleimstoffen und Aromastoffen herrührt (EISENBRAND und SCHREIER, 2006).



Abbildung 14: *Tilia tomentosa* (BORZAN, 2001)

### 2.6.2 Inhaltsstoffe und Verwendung

Silberlindenblüten enthalten etwa 1 % Flavonoide, fast ausschließlich Glykoside der Flavonole Quercetin und Kämpferol, insbesondere Isoquercitrin, Quercitrin, Hyperosid und Rutin sowie Astragalin (Kämpferol-3-O-glucosid) und Afzelin (Kämpferol-3-O-rhamnosid) sowie das Tilirosid, bei dem es sich um einen p-Cumarsäureester des Afzelins handelt. Weitere Inhaltsstoffe sind mit ca. 10 % Schleimstoffe, 2 % Gerbstoffe vom Catechin- und Gallocatechin-Typ, verschiedene Phenylpropansäuren und etwa 0,2 % ätherisches Öl, welches aus verschiedenen n-Alkanen, Phenylpropanen und Monoterpenen besteht.

Die häufigste Darreichungsform in der Volksmedizin ist der Teeaufguss. Aufgrund seiner krampflösenden, schweißtreibenden und schleimlösenden Eigenschaften wird er bei Katharren der Atemwege eingesetzt, wirkt hustenreizstillend und beruhigt Halsschmerzen. Die enthaltenen Glykoside der Silberlindenblüte besitzen weiterhin eine krampflösende, schmerzstillende und entzündungshemmende Wirkung. Aus diesem Grund werden sie vorwiegend bei fieberhaften Erkrankungen, grippalen Infekten und in Erweiterung bei Rheuma, Nierenentzündung und Ischias eingesetzt. In der Behandlung von Migräne und Magenbeschwerden findet der Tee außerdem Anwendung. Silberlindenblüten werden weiterhin zur Linderung von Unruhezuständen eingesetzt, da sie im Verdacht stehen, eine beruhigende Wirkung zu besitzen. Auch der Einsatz in Badekonzentraten basiert auf dieser Wirkung (EISENBRAND und SCHREIER, 2006).

## 2.7 Hopfen (*Humulus lupulus*)

### 2.7.1 Botanik

Klasse:	Dreifurchenpollen-Zweikeimblättrige (Rosopsida)
Unterklasse:	Rosenähnliche (Rosidae)
Ordnung:	Rosenartige (Rosales)
Familie:	Hanfgewächse (Cannabaceae)
Gattung:	Hopfen ( <i>Humulus</i> )

Der zu den Hanfgewächsen zählende Hopfen, eine 6-8 m hohe zweihäusige Schlingpflanze, ist heute in allen Ländern der gemäßigten Zone verbreitet und kultiviert. Hopfen gedeiht im Wesentlichen nur zwischen dem 35. und 55. Breitengrad der nördlichen und südlichen Halbkugel, weil hier die nötigen langen Sommertage die Voraussetzung für die Blüte erfüllen.

Die zapfenähnlichen, gelbgrünen, stark riechenden Fruchtsände der weiblichen Pflanzen tragen auffällige Deckblätter, die reich an Harz- und Bitterstoff-führenden Drüsen sind (**Abbildung 15**). Der männliche Hopfen wird allein zur Schaffung neuer Sorten verwendet. Die Vermehrung erfolgt vegetativ durch Fehser. Zu der bekannten Verwendung beim Bierbrauen werden die ganzen, noch unreifen Zapfen im August und September geerntet und getrocknet (EISENBRAND und SCHREIER, 2006).



**Abbildung 15:** *Humulus lupulus* ([www.gewuerzlexikon.de/hopfen.html](http://www.gewuerzlexikon.de/hopfen.html))

### 2.7.2 Inhaltsstoffe und Verwendung

Die wichtigsten Bestandteile des Hopfens sind das Hopfenöl, das Lupulin (Hopfenmehl) und die Bitterstoffe. Flavonoide sind in Form von Quercetin und Kämpferolglykosiden sowie Catechin und Proanthocyanidinen nur zu einem geringen Anteil enthalten. In frischem Hopfen liegen vorwiegend

$\alpha$ -Bittersäuren (Humulon, Cohumulon, Colupulon, Adhumulon) und  $\beta$ -Bittersäuren (Lupulon, Colupulon, Adlupulon) vor. Bei Trocknung, Lagerung und Verarbeitung entsteht durch Isomerisierung, Oxidation und Polymerisation eine große Zahl von Folgeprodukten. (EISENBRAND und SCHREIER, 2006).

In der Pharmazie wird Hopfen wegen seiner allgemeinen beruhigenden Wirkung und seiner Bitterstoffe angewendet, z.B. als Hopfentee. Den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Säuren werden gemeinhin antibakterielle, antifugale sowie antikarzinogene Eigenschaften zugesprochen. Das in der unlöslichen Harzfraktion enthaltene Polyphenol Xanthohumol wird als potentiell krebsschemopräventiv eingestuft (EISENBRAND und SCHREIER, 2006).

## **2.8 Ausgewählte angewandte Testsysteme und Methoden**

### **2.8.1 Bestimmung der antioxidativen Aktivität des Pflanzenmaterials (TEAC-Assay)**

Eine aktuelle Literaturrecherche ergibt eine Vielzahl an Methoden, die sich mit der Bestimmung der antioxidativen Aktivität befassen. Darunter gibt es verschiedene photometrische, biochemische und spektroskopische Methoden, die sich grundlegend in ihrer Funktionsweise unterscheiden. Zu den am häufigsten zur Charakterisierung primärer Antioxidantien verwendeten Methoden gehören der DPPH-Assay (Diphenylpicrylhydrazyl), der TEAC-Assay (trolox equivalent antioxidant capacity) und der ORAC-Assay (Oxygen Radical Absorbing Capacity). Der TEAC-Test ist das am häufigsten verwendete Testsystem in der Lebensmittelanalytik und wurde auch in dieser Arbeit angewendet. Die ursprünglich von MILLER et al. (1993) entwickelte Methode basiert auf der Eigenschaft antioxidativer Substanzen, das Radikal  $\text{ABTS}^+$  (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) abzufangen. Nach der in dieser Arbeit angewendeten modifizierten Methode nach RE et al. (1999) wird ABTS zunächst durch Kaliumpersulfat zu einem Radikalkation oxidiert, welches eine intensiv blaue Farbe besitzt. Werden der radikalischen Lösung antioxidative Substanzen hinzugesetzt, vermindert sich durch die Reduktion des  $\text{ABTS}^+$ -Radikals die Farbintensität, welche photometrisch bei 734 nm gemessen werden kann. Je stärker die Lösung entfärbt ist, desto höher ist die antioxidative Aktivität der getesteten Probe. Als Bezugssubstanz wird das wasserlösliche, synthetische Vitamin E-Derivat Trolox® (6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) eingesetzt, weshalb die Ergebnisse in Trolox-Äquivalenten angegeben werden. Die modifizierte Methode nach RE et al. (1999) hat den Vorteil, dass sowohl hydrophile als auch lipophile Substanzen getestet werden können.

### **2.8.2 Bestimmung der antioxidativen Aktivität des Blutplasmas (ORAC-Assay)**

Der ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) Assay ist eine Methode zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität in biologischen Proben und ist weitestgehend in der Plasma- und Urinanalytik etabliert. Das Prinzip beruht auf der Messung eines radikalinduzierten oxidativen Abbaus einer fluoreszierenden Substanz, in diesem Fall Fluorescein, welcher durch das Vorhandensein von Antioxidantien in der Probelösung durch Neutralisierung verzögert wird. Je mehr



Antioxidantien die Probelösung also enthält, desto langsamer und geringer erfolgt der Abbau des Fluoreszeins.

Der ORAC-Assay wurde nach der Arbeitsvorschrift von DAVALOS et al. (2004) von den Kooperationspartnern in der Leibniz Universität Hannover durchgeführt.

### **2.8.3 Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes (Folin-Ciocalteu-Test)**

Das Prinzip der Folin-Ciocalteu-Methode beruht auf der Reduktion eines aus Wolframat und Molybdat-Ionen mit Phosphorsäure gebildeten Komplexes durch leicht oxidierbare Stoffe (wie Polyphenole) zu Wolfram- und Molybdänblau. Der entstehende Farbkomplex wird spektralphotometrisch bei 760 nm vermessen und ist proportional zum Gehalt an oxidierbaren Stoffen. Als Bezugssubstanz dient in dieser Arbeit Gallussäure, weshalb die Ergebnisse als Gallussäure-Äquivalente angegeben werden. Die eingesetzte Arbeitsvorschrift zur Durchführung entspricht der international genormten Methode nach DIN ISO 14502-1. Es ist zu beachten, dass neben den Flavonoiden auch andere Verbindungen wie Ascorbinsäure oder Proteine miterfasst werden, da sie durch ihre Hydroxygruppen das Reagenz ebenfalls reduzieren. Dadurch besteht die Möglichkeit der Vortäuschung eines höheren Polyphenolgehaltes.

### **2.8.4 NMR-Spektroskopie**

Zur endgültigen Strukturaufklärung der isolierten Verbindungen dienen ein- und zweidimensionale  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren. Die Lage der Signale in den Spektren sowie deren Kopplungskonstanten im  $^1\text{H}$ -Spektrum zwischen Signalen benachbarter Protonen lassen Rückschlüsse auf strukturelle Merkmale zu. Eine eindeutige Zuordnung von Signalen war meist erst anhand zweidimensionaler NMR-Spektren möglich, die häufig als Konturdiagramm (quadratisch) dargestellt werden. Der Vorteil mehrdimensionaler Verfahren im Vergleich zu herkömmlichen  $^1\text{H}$ -NMR-Experimenten besteht darin, dass Kopplungen zwischen den einzelnen Kernen sichtbar gemacht werden können. Es handelt sich dabei sowohl um indirekte Spin-Spin-Kopplungen (über Bindungen) als auch direkte Spin-Spin-Kopplungen über den Raum. Somit ergibt sich die Möglichkeit, mittels 2D-NMR-Spektroskopie Informationen über die räumliche Struktur von Molekülen zu erhalten (RÜCKER et al., 2008; HESSE et al., 1995; [www.fiz-chemie.de](http://www.fiz-chemie.de)). Einige Grundlagen verschiedener 2D-Techniken seien an dieser Stelle aufgeführt:

#### **2.8.4.1 $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY-Experiment**

Im  $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (Correlated Spectroscopy) sind auf beiden Achsen die  $^1\text{H}$ -chemischen Verschiebungen aufgetragen, prinzipiell sind also auf beiden Achsen die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren zu sehen. Ein solches Spektrum enthält eine Diagonale. Alle Signale auf der Diagonalen stellen das eindimensionale  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum dar. Kreuzsignale treten dann auf, wenn zwei Protonen miteinander koppeln. Jeweils zwei Diagonal- und zwei Kreuzsignale bilden die Ecken eines Quadrates, welches wiederum eine  $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -Kopplung darstellt. In long-range COSY-Spektren können Kopplungen bis zu vier Bindungen aufgezeichnet werden.

#### 2.8.4.2 HSQC-Experiment

Das HSQC-Experiment (Heteronuclear Single Quantum Coherence) liefert NMR-Spektren, bei denen auf der x-Achse die  $^1\text{H}$ -chemische Verschiebung und auf der y-Achse die  $^{13}\text{C}$ -chemische Verschiebung miteinander korreliert sind. Anhand der Kreuzsignale können hier nur direkte Kopplungen bestimmt werden.

#### 2.8.4.3 HMBC-Experiment

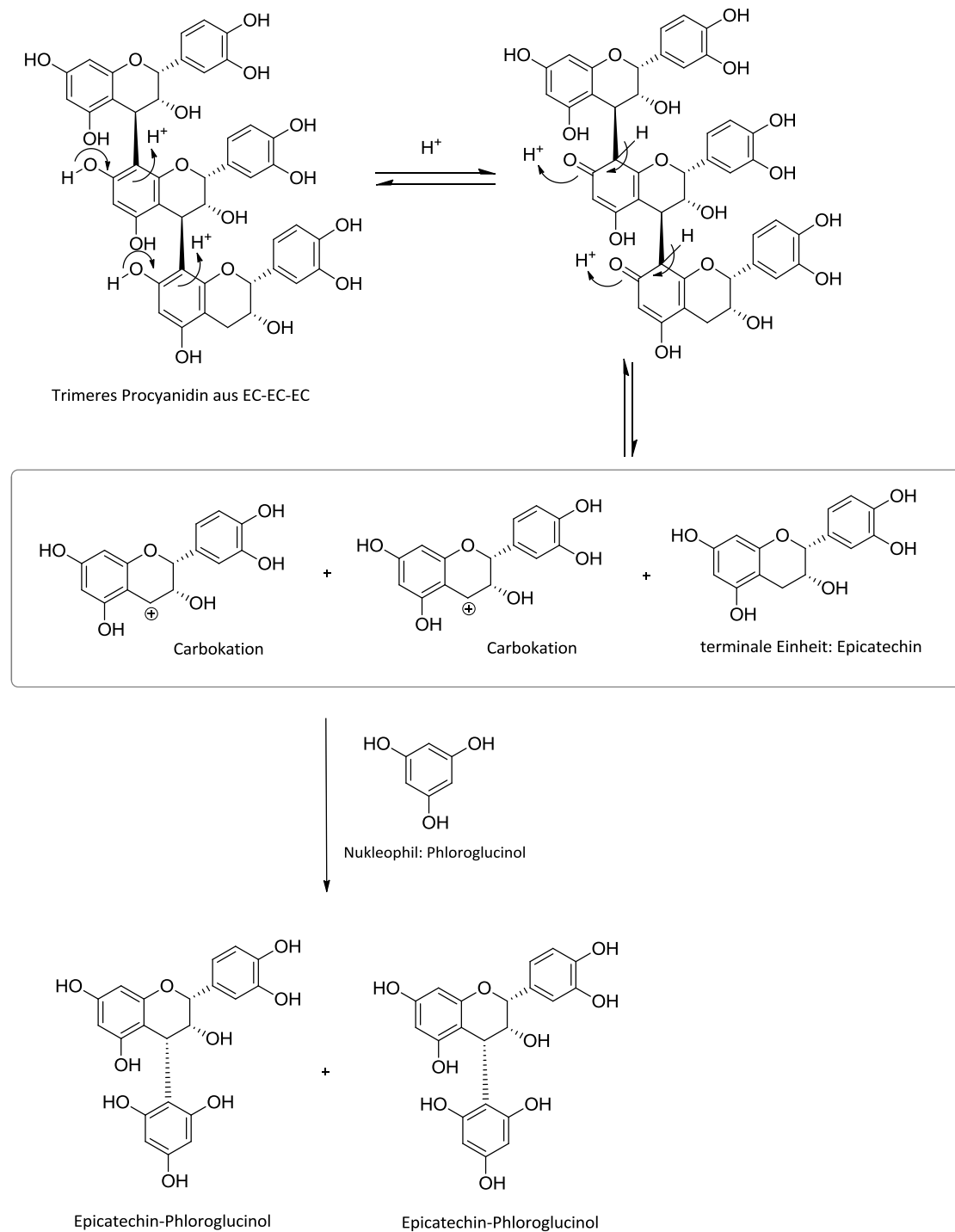
Im Gegensatz zu HSQC-Spektren können in HMBC-Spektren (Heteronuclear Multi Bond Correlation) Korrelationen über 2 oder 3 Bindungen hinweg, z.B. zwischen  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -Atomen sichtbar gemacht werden. Das HMBC-Experiment ist eines der empfindlichsten Verfahren für Fernkorrelationen. Unter anderem ist es dadurch möglich, quartäre Kohlenstoffe zuzuordnen und Verknüpfungen festzulegen.

#### 2.8.4.4 NOESY- und ROESY-Experiment

Der Unterschied des NOESY-Experimentes (Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy) im Vergleich zu den anderen erläuterten 2D-Verfahren (COSY, HSQC, HMBC) besteht darin, dass hier keine Beziehungen zwischen Kernen, die über skalare Spin-Spin-Kopplungen, d.h. über Bindungen, miteinander in Wechselwirkung treten, sichtbar gemacht werden, sondern Wechselwirkungen zwischen koppelnden Kerndipolen, die direkt über den Raum übertragen werden. Dieser Magnetisierungstransfer über den Raum erfolgt über den Kern-Overhauser-Effekt. So zeigen die Kreuzsignale die räumliche Nachbarschaft von Kernen an. Vorteilhaft ist die Aufnahme eines NOESY-Spektrums, wenn Beziehungen zwischen Protonen vermutet werden, die zwar über viele Bindungen voneinander getrennt (keine Signale im COSY-Spektrum), aber sich räumlich sehr nahe sind. Insbesondere bei Verbindungen mit Molmassen über 1000 Da empfiehlt sich die **ROESY**-Technik (Rotating frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), die innerhalb dieser Arbeit bei den Procyanidinen angewendet wurde.

#### 2.8.5 Säurekatalysierte Degradation (Phloroglucinolyse)

In der Polymeranalytik fungiert die Phloroglucinolyse unter anderem zur Strukturaufklärung von Proanthocyanidinen. Das Prinzip der Methode beruht auf der säurekatalysierten Degradation, bei der die interflavanoiden Bindungen der polymeren Proanthocyanidine gespalten werden. Dabei entstehen aus den oberen Einheiten positiv geladene Carbokationen, während die terminale Einheit erhalten bleibt. Die positiv geladenen Carbokationen reagieren mit dem Nukleophil Phloroglucinol zu entsprechenden Phloroglucinol-Addukten. Durch das Beibehalten der Stereochemie der Flavan-3-ole ist die Bestimmung der Flavan-3-ol-Verteilung und somit auch der Rückschluss auf die einzelnen Bausteine des entsprechenden Proanthocyanidins möglich. Darüber hinaus dient die Methode zur Bestimmung des Polymerisationsgrades, indem der Quotient aus der Anzahl aller gespaltenen Äquivalente und der Anzahl der terminalen Flavan-3-ole gebildet wird (KENNEDY und JONES, 2001; MATTHEWS et al., 1997). Das Prinzip der Methode ist in **Abbildung 16** dargestellt.

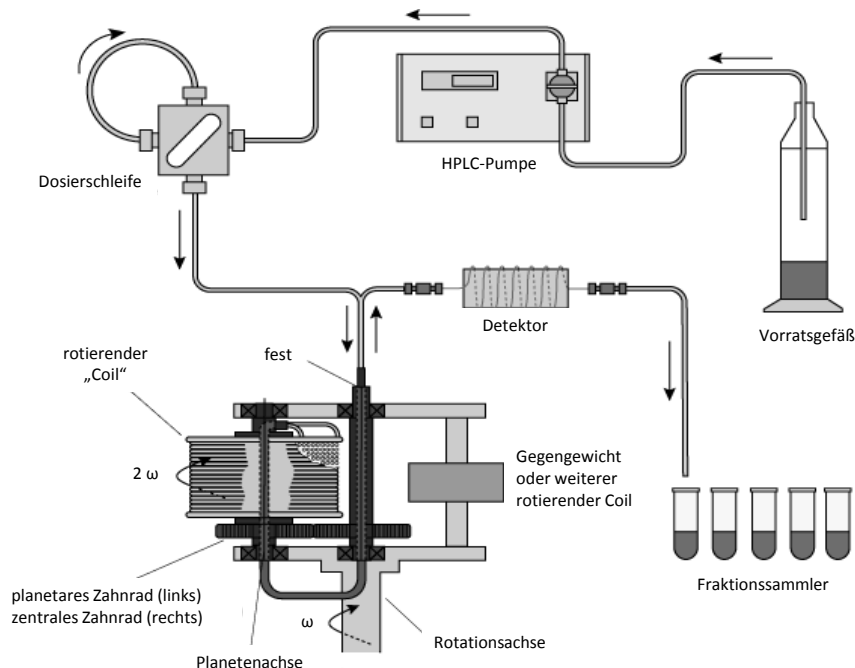


**Abbildung 16:** Mechanismus der Phloroglucinolyse am Beispiel des trimeren Procyanidins C1 ((-)-Epicatechin-(4→8)-(-)-Epicatechin-(4→8)-(-)-Epicatechin) nach KENNEDY und JONES (2001)

## 2.9 Präparative Trenntechniken

### 2.9.1 Countercurrent Chromatography

Bei der Gegenstromverteilungschromatographie (Countercurrent chromatography) handelt es sich um eine leistungsfähige, präparative, verteilungschromatographische Trenn- und Isolierungsmethode, die von ITO et al. (1966) in den sechziger Jahren entwickelt wurde. Sie wird zur Isolierung von Naturstoffen aus komplexen Pflanzenextrakten eingesetzt. Die Trennung beruht dabei auf der Verteilung zwischen zwei nicht miteinander mischbaren flüssigen Phasen, wodurch das zu trennende Stoffgemisch in Fraktionen unterschiedlicher Polarität getrennt wird. Der wesentliche Unterschied zwischen der CCC und einem Scheidetrichter liegt in der Bewegung der beiden Phasen, da bei der CCC die Phasen nicht ruhen, sondern die eine an der anderen vorbeigeführt oder durch sie hindurch geleitet wird (CONWAY, 1990). Das besondere Merkmal im Vergleich zur klassischen Chromatographie liegt in der Verwendung zweier flüssiger Phasen. Der Verzicht auf eine feste stationäre Phase (Trägermaterialien) ermöglicht eine vollständige Probenrückgewinnung, da keine irreversiblen Adsorptionen oder oberflächenkatalysierten Reaktionen auftreten können. Die Möglichkeit der Fraktionierung einer großen Probenmenge und die vielseitige Auswahl an Lösungsmittelsystemen sind weitere Vorteile der CCC. Der Aufbau einer CCC-Anlage ist mit dem einer HPLC-Anlage vergleichbar. Das Lösungsmittel wird über die HPLC-Pumpe aus dem Vorratsgefäß durch eine Dosierschleife auf das Trennsystem gefördert. Die Trennung wird mittels Detektor, meistens über UV/Vis-Absorption (aber auch über Fluoreszenz-, Brechungsindex-, Lichtstreu- oder MS-Detektoren) aufgezeichnet und die eluierenden Substanzen werden mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen (**Abbildung 17**).



**Abbildung 17:** Aufbau einer CCC-Anlage nach SUTHERLAND (1987)

Durch einen in Rotation versetzten, geschlossenen Coil, der mit einem Zweiphasensystem gefüllt ist, kommt es zur Anreicherung der leichten Phase am "Head"-Ende und der schweren Phase am "Tail"-Ende. Um das Verlassen der leichteren Phase bei einer HSCCC-Trennung aus dem System zu verhindern, wird von diesem Ende ("Head") die schwere Phase eingepumpt. So wird die Phase auf dem Coil gehalten und durch die schwere Phase zum "Tail"-Ende verdrängt, wo diese eluiert. Unterschieden werden zwei Arten: "Head-to-Tail" (die leichte Phase ist die stationäre Phase) und "Tail-to-Head" (die schwere Phase ist die stationäre Phase) (ITO, 1992 und ITO et al., 2005). Die Auswahl und die Optimierung eines geeigneten Fließmittelsystems sind für den Erfolg einer HSCCC-Trennung von entscheidender Bedeutung. Das Fließmittelsystem sollte über ein geeignetes Phasenmischverhalten (Einstellung der Phasengrenze) und eine geeignete Polarität verfügen. Die HSCCC-Trennung basiert auf der unterschiedlichen Verteilung der Substanzen in den beiden nicht miteinander mischbaren Phasen. Für diese Verteilung gilt das Nernst'sche Verteilungsgesetz (CONWAY, 1991):

$$K = \frac{c(\text{obere Phase})}{c(\text{untere Phase})}$$

mit  $K$  = Verteilungskoeffizient,  $c$  = Konzentration der Probe.

Für eine erfolgreiche Trennung sollte der Verteilungskoeffizient  $K$  zwischen 0,5 und 1,5 liegen. Bei kleineren Koeffizienten erfolgt eine schnelle Elution, was eine schlechte und ungenügende Auftrennung der Substanzen zur Folge hat. Bei größeren Koeffizienten kommt es zu langen Trennungen, aus denen eine deutliche Peakverbreiterung resultiert. Außerdem sollte das Fließmittel vorher auf die zeitlich abgeschlossene Phasentrennung getestet werden, da für optimale Trennbedingungen Zeiten von 15 bis 30 Sekunden eingehalten werden sollten. Der Wert der Retention sollte idealerweise über 50 % liegen. Die Retention  $R_s$  lässt sich mit folgender Gleichung berechnen:

$$R_s = \frac{V_s}{V_c} = \frac{(V_c - V_m)}{V_c}$$

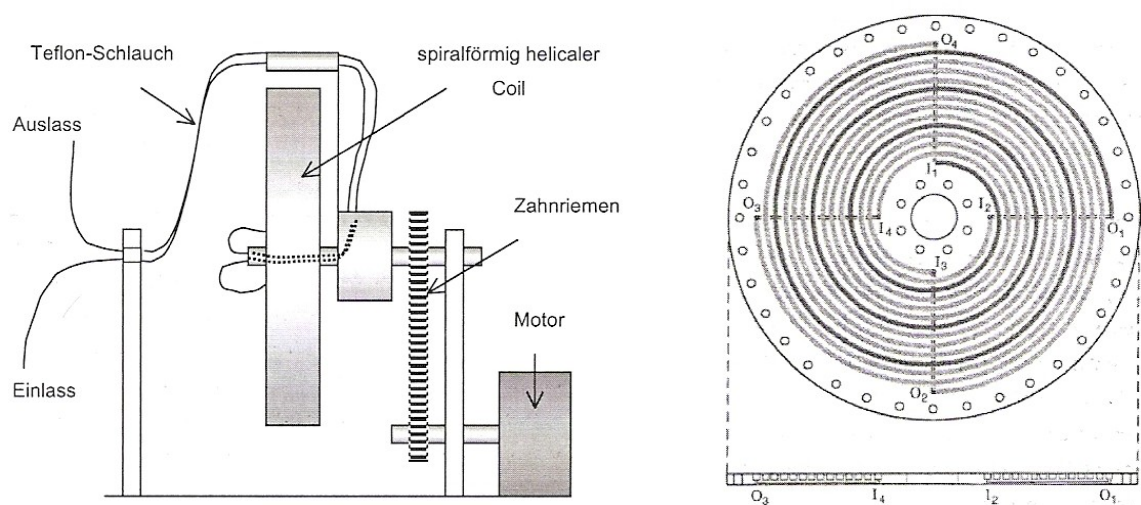
mit  $R_s$  = Retention,  $V_s$  = Volumen der stationären Phase,  $V_c$  = Coilvolumen,  $V_m$  Volumen der mobilen Phase

### 2.9.1.1 Spiral-Coil LSRCCC

Die Low-speed countercurrent chromatography (LSRCCC) ist wie die HSCCC ein hydrodynamisches System und fraktioniert den zu trennenden Analyten ebenfalls durch Rotation und stetes Mischen und Entmischen zweier nicht miteinander mischbarer Phasen. Ihr Aufbau entspricht ebenfalls einer HPLC-Anlage. Der wesentliche Unterschied zur CCC sind das große Coilvolumen von etwa 5,6 L und die damit verbundene hohe Probeaufgabemenge von bis zu 40 g sowie eine niedrigere Rotationsgeschwindigkeit von 0-40 rpm. Aufgrund der großen Probemenge können Minorkomponenten angereichert werden. Durch den Einsatz von Schläuchen mit helical eingearbeiteter Wandungsform („convoluted tubing“) konnte die Trennleistung mit einer besseren Durchmischung der Phasen erheblich gesteigert werden.

Die Spiral LSRCCC, auch als Spiral-Coil LSRCCC (Durchflusszentrifuge mit spiralförmig helical gewundenem Coil) bezeichnet, ist eine weitere Variante der LSRCCC und kann ebenfalls große Probemengen fraktionieren. Mit dieser neuen Technik können sehr polare Verbindungen wie beispielsweise Polyphenole besser aufgetrennt und fraktioniert werden. Aufgrund einer Vielzahl von Problemen bei der Verwendung polarer Fließmittelsysteme für HSRCCC-Trennungen haben ITO et al. (2003) die Geometrie der helicalen Coil-Dimension verändert. Das größte Problem der HSRCCC-Anlage ist die zu stark reduzierte Retention der stationären Phase aufgrund hoher Viskositäten und geringen Grenzflächenspannungen im Multilayercoil. Bei der Spiral-Coil wurden die herkömmlichen Multilayercoils durch spezielle Teflonscheiben (Spiral-Disk), in welche spiralförmig gewundene Kanäle als Trennstrecke eingearbeitet sind, ersetzt. Diese Scheiben dienen zur Vergrößerung des Volumens und sind beliebig übereinander stapelbar. Bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Spiral-Coil LSRCCC sind zehn Spiralen hintereinander zu einem Coilvolumen von 5,6 L geschaltet. Durch die Verwendung der Multilayercoils, die planar, coaxial und synchron in einer J-Typ-Zentrifuge angeordnet sind, bleibt das heterogene Kraftfeld erhalten. Die spiralen Windungen führen zu einer deutlichen Zunahme der radialen Kräfte, die sich positiv auf die Trennung bei polaren Fließmittelsystemen auswirken. Die Radialkräfte bewirken eine bevorzugte Bewegung der schweren Phase zum äußeren Spirallende und die leichtere Phase kann einfacher nach innen verdrängt werden. Durch diese Veränderungen konnte die Retention an stationärer Phase deutlich verbessert werden (ITO et al., 2003; KÖHLER, 2006). Durch die Kombination des unilateralen Fließverhaltens von Archimedischer Schraube und dem Spiral-Effekt ist die Anwendung höherer Fließgeschwindigkeiten im Vergleich zur LSRCCC möglich (80-150 U/min) (KÖHLER, 2006). Somit ist die resultierende kürzere Trennzeit als weiterer Vorteil zu nennen.

**Abbildung 18** zeigt den schematischen Aufbau eines spiralförmigen Coils. Alle Ein- und Auslässe sind in Serie geschaltet. Durch den Einlass  $I_1$  wird die mobile schwere Phase in den Coil gepumpt, fließt zum Auslass  $O_1$  und weiter zum Einlass  $I_2$  bis sie schließlich zum Auslass  $O_4$  gelangt, wo sie aus dem Coil austritt.



**Abbildung 18:** Schematischer Aufbau einer Spiral-Coil-Anlage (links) sowie des spiralförmigen Coils (frontal, rechts) nach KÖHLER (2006) und ITO et al. (2003)

Je nach Wahl der mobilen Phase (leichte Phase „U“, schwere Phase „L“), der Rotationsrichtung (im Uhrzeigersinn „H“, gegen Uhrzeigersinn „T“) und der Fließrichtung der mobilen Phase (von innen nach außen „I“, von außen nach innen „O“) sind theoretisch acht Elutionsmodi möglich, wobei die vier Elutionsmodi L-I-H, L-I-T, U-O-T und U-O-H als sinnvoll betrachtet werden (KÖHLER, 2006). Während bei dem L-I-T Modus die schwere Phase die mobile Phase ist, und diese von innen zum Tail to Head-Ende eluiert, fließt diese beim L-I-H Modus von innen zum Head to Tail-Ende. Bei den U-O-T und U-O-H Modi fungiert die leichte Phase als mobile Phase und eluiert von außen zum Tail to Head Ende bzw. zum Head to Tail Ende.

Die vier Elutionsmodi L-O-T, L-O-H, U-I-T und U-I-H sind für die Trennung nicht geeignet, da bei diesen Modi bevorzugt die stationäre Phase eluiert, was eine schlechte Retention der stationären Phase zur Folge hat und somit auch eine schlechte Trennung des Analyten (Ito et al., 2003).

## **2.10 Zielsetzung**

Innerhalb dieser Arbeit sollten die Inhaltsstoffe von Holunder- und Silberlindenblüten sowie Hopfendolden charakterisiert und quantifiziert werden, weiterhin sollte innerhalb einer Humanstudie die Bioverfügbarkeit der Komponenten eines Holunderblütenaufgusses bestimmt werden. Anhand der im cross-over Design durchgeführten Humanstudie sollte außerdem die Bioverfügbarkeit eines praxisüblichen Holunderblütentees mit einer aus Holunderblüten isolierten antioxidativen Fraktion verglichen werden, um zu erörtern, ob und welchen Einfluss die Matrix eines solchen Getränkes auf die Bioverfügbarkeit der antioxidativen Verbindungen hat.

Die hohe antioxidative Kapazität der in der Volksmedizin vielfach beschriebenen Silberlindenblüten wurde innerhalb dieser Arbeit ebenfalls analysiert. In diesem Zusammenhang sollten Hauptinhaltsstoffe isoliert sowie deren antioxidative Aktivitäten im Einzelnen bestimmt werden, um den Beitrag zur gesamten antioxidativen Kapazität der Blüten abschätzen zu können.

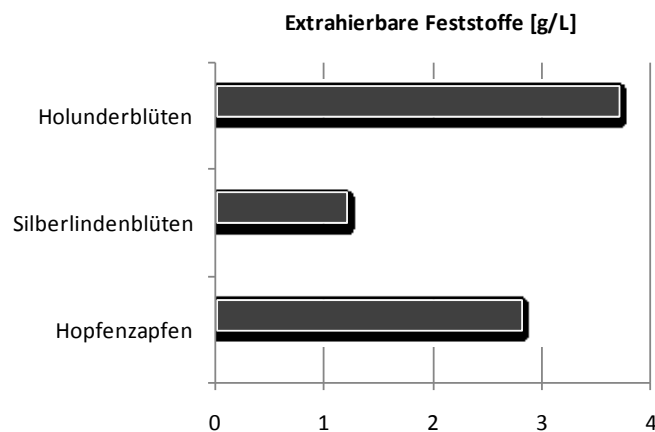
### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Übersichtsuntersuchungen der untersuchten Kräutertees

##### 3.1.1 Extrahierbare Feststoffe

Der Extraktgehalt dient als Bezugsgröße dem Vergleich von antioxidativen Aktivitäten und Gesamtphenolgehalten, denn anhand dieses Parameters kann bestimmt werden, welcher Pflanzenextrakt eine hohe antioxidative Wirksamkeit bzw. eine hohe Menge an Polyphenolen liefert.

In **Abbildung 19** sind die Extraktgehalte der drei innerhalb dieser Arbeit untersuchten Pflanzenextrakte in g/L bezogen auf die Einwaagen von 10 g in einem Liter Wasser bei einer Ziehzeit von 10 Minuten dargestellt.



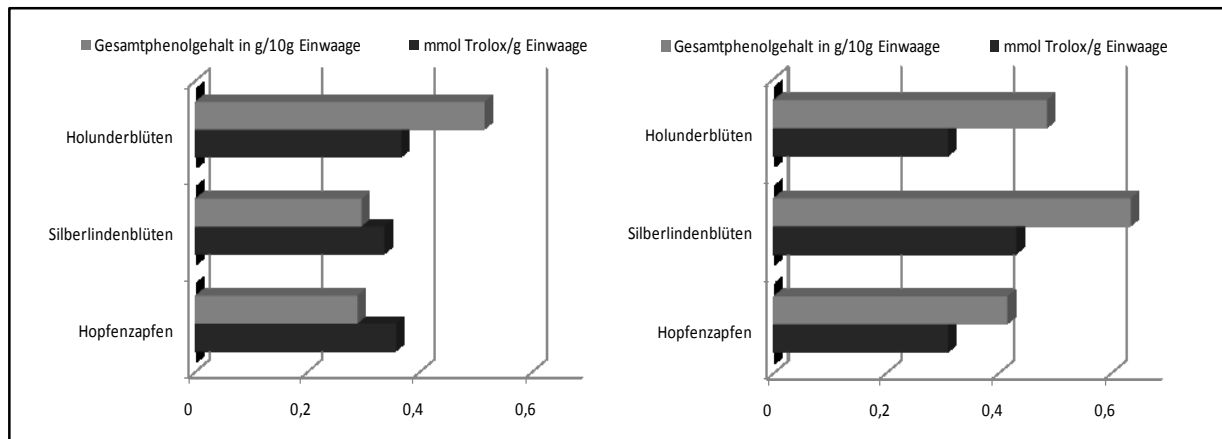
**Abbildung 19:** Extrahierbare Feststoffe in g/L bezogen auf 10 g/L

Holunderblüten besitzen mit 3,7 g/L den höchsten Extraktgehalt der drei untersuchten Naturstoffe. Wie die nachfolgenden Untersuchungen zeigten, enthalten Holunderblüten einen hohen Anteil an freiem und glykosidisch gebundenem Zucker, was die hohe Extraktausbeute erklären könnte. Der geringe Extraktgehalt der untersuchten Silberlindenblüten kommt durch die stark gelbildenden Inhaltsstoffe zu Stande, die durch ihr Aufquellen in Wasser vermutlich zu einem verfälschten Ergebnis führten, da die extrahierten Feststoffe aufgrund der starken Gelbildung nicht in das Filtrat übergehen konnten.

##### 3.1.2 Antioxidativität und Gesamtphenolgehalt

**Abbildung 20** zeigt die antioxidativen Aktivitäten und Gesamtphenolgehalte der wässrigen und methanolischen Extrakte, angegeben als Trolox®- bzw. Gallussäure-Äquivalente. Für eine bessere Vergleichbarkeit sind die Gesamtphenolgehalte in g/10 g Einwaage angegeben.

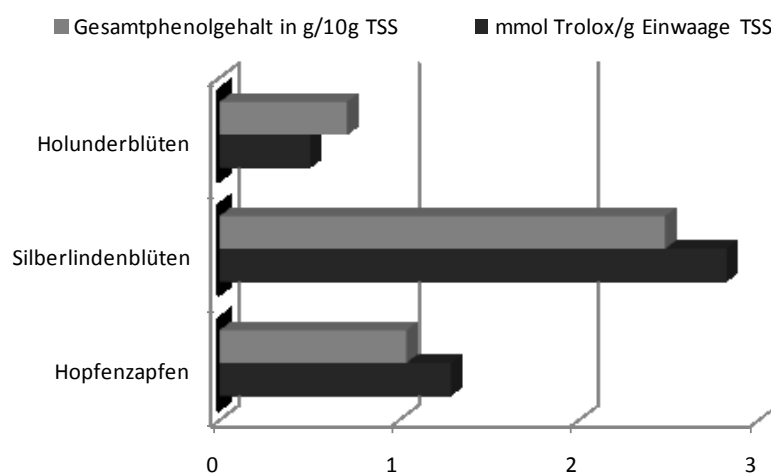




**Abbildung 20:** Antioxidative Aktivität und Gesamtphenolgehalte der wässrigen (links) und methanolischen Extrakte (rechts)

Wie zu erwarten war, sind sowohl für die antioxidativen Aktivitäten als auch für die Gesamtphenolgehalte in den methanolischen Extrakten höhere Werte zu finden. Während die Gehalte im wässrigen Extrakt in etwa denen in einem handelsüblichen Teeaufguss entsprechen, kann mit Hilfe des 70 % igen Methanols eine nahezu vollständige Extraktion der Zielkomponenten erreicht werden, womit wiederum höhere antioxidative Kapazitäten und Gesamtphenolgehalte zu finden sind (POKORNY, 2005). So besitzt der wässrige Silberlindenblütenextrakt eine vergleichsweise niedrige antioxidative Wirksamkeit sowie einen geringen Gesamtphenolgehalt, während der methanolische Extrakt die höchste antioxidative Aktivität und den höchsten Polyphenolgehalt im Vergleich zu den Holunderblüten und Hopfenzapfen aufweist. Ursache dafür ist die durch die starke Gelbildung verminderte Extraktion von Phenolen innerhalb des wässrigen Silberlindenblütenextraktes (siehe auch Punkt 3.1.1), die zur geringeren antioxidativen Wirksamkeit führt. Neben den Silberlindenblüten weisen die Holunderblüten einen hohen Gesamtphenolgehalt und eine erhöhte antioxidative Aktivität auf.

Werden die Werte nicht auf die jeweiligen Einwaagen bezogen, sondern auf die extrahierbaren Feststoffe (TSS), so erhält man eine Aussage über die Wirksamkeit der einzelnen Extrakte (**Abbildung 21**):



**Abbildung 21:** Antioxidative Aktivität und Gesamtphenolgehalte der wässrigen Extrakte bezogen auf extrahierbare Feststoffe (TSS)

Anhand dieser Darstellung wird abermals deutlich, dass der Silberlindenblütenextrakt ein sehr hohes Potential an antioxidativ wirksamen Verbindungen besitzt. Dieser liefert wie bereits erwähnt aufgrund der unzureichenden Extraktion zwar nur sehr wenig Extrakt (14 %), dennoch ist dieser antioxidativ sehr wirksam. Wie sich in den folgenden Ergebnissen dieser Arbeit zeigt, sind hohe Gehalte an Phenolcarbonsäuren (u.a. Protocatechusäure, Vanillinsäure, Gallussäure) und monomeren sowie oligomeren Proanthocyanidinen als Ursache dafür anzusehen.

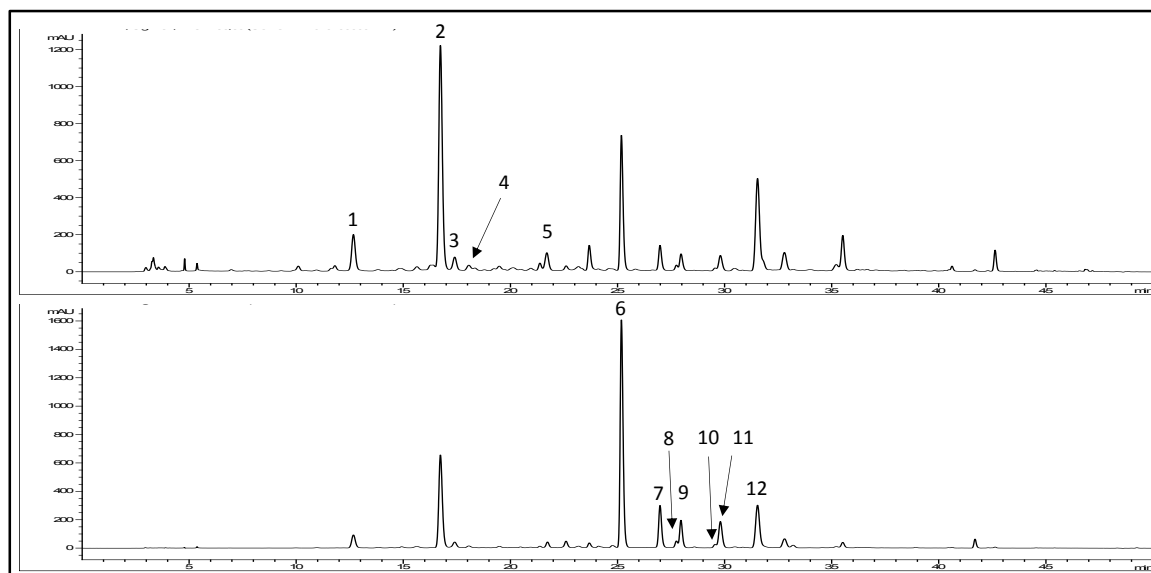
Hingegen liefern Holunderblüten mit 37 % deutlich mehr Extrakt, haben aber im Vergleich nur einen geringen Phenolgehalt von 7 % und eine geringe antioxidative Aktivität (0,5 mmol Trolox). Eine mögliche Ursache könnte der hohe Anteil an freiem und glykosidisch gebundenem Zucker sein, der zwar viel Extrakt liefert, jedoch keinen Beitrag zur antioxidativen Aktivität leistet.

## 3.2 Holunderblüten

### 3.2.1 Polyphenolprofil

Nach WHO (2002) enthalten Holunderblüten etwa 3 % Flavonoide, darunter Quercetin-3-rutinosid (Rutin), Quercetin-3-glucosid (Isoquercitrin), Quercetin-3-rhamnosid (Quercitrin), Kämpferol-3-glucosid (Astragalin) und Quercetin-3-galactosid (Hyperosid). Weiterhin werden Hydroxyzimtsäurederivate wie Chlorogen-, Ferula-, Kaffee- und Cumarsäure beschrieben. Andere Inhaltsstoffe sind ätherisches Öl, verschiedene Sterole und das cyanogene Glykosid Sambunigrin.

**Abbildung 22** zeigt HPLC-Chromatogramme eines methanolischen Holunderblütenextraktes bei 324 nm zur Identifizierung der Hydroxyzimtsäurederivate und bei 354 nm zur Identifizierung der Flavonoide.



**Abbildung 22:** HPLC-DAD-Chromatogramme eines methanolischen Holunderblütenextraktes bei 324 nm (oben) und 354 nm (unten), (Peakzuordnung siehe **Tabelle 1**)

### 3.2.2 Quantitative Bestimmungen

Anhand eines methanolischen Extraktes und eines praxisüblichen Teeaufgusses wurden die Gehalte der in **Abbildung 22** gezeigten Hauptinhaltsstoffe bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 1** zusammengefasst.

**Tabelle 1:** Gehalte der Flavonol-O-glykoside und Hydroxyzimtsäurederivate in Holunderblüten in mg/kg bezogen auf die Trockensubstanz

Peak	Verbindung	t <sub>R</sub> [min]	Gehalt [mg/kg TS] im methanolischen Extrakt	Gehalt [mg/kg TS] im wässrigen Extrakt
1	3-Kaffeoylchinasäure	12,7	2613	2423
2	5-Kaffeoylchinasäure	16,8	15608	14341
3	4-Kaffeoylchinasäure	17,2	635	297
4	3-Feruloylchinasäure	18,1	362	279
5	5-p-Cumaroylchinasäure	21,9	1134	921
6	Quercetin-3-rutinosid	25,2	20647	16287
7	Quercetin-3-glucosid/galactosid	27,0	2845	1795
8	Kämpferol-3-rutinosid	27,8	1308	1237
9	Isorhamnetin-3-rutinosid	28,0	2903	1781
10	Kämpferol-3-glucosid/galactosid	29,5	759	512
11	Isorhamnetin-3-glucosid/galactosid	29,8	931	408
12	di-Kaffeoylchinasäure	31,6	13102	8114

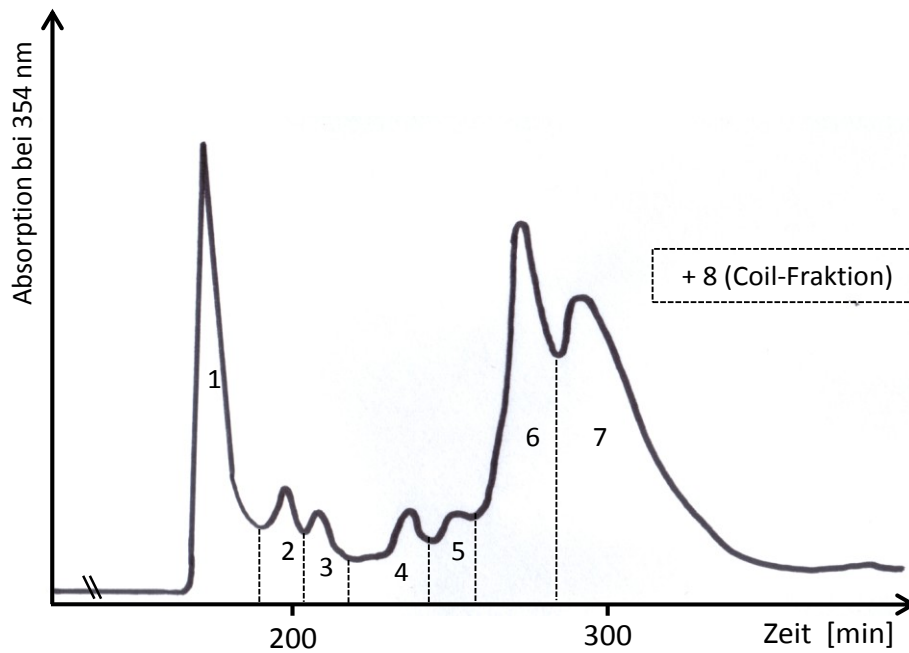
Hauptinhaltsstoffe der Holunderblüten sind sowohl die Hydroxyzimtsäurederivate 5-Kaffeoylchinasäure und di-Kaffeoylchinasäure als auch das Flavonol-O-glykosid Quercetin-3-rutinosid. Daneben sind verschiedene Flavonol-O-glykoside und weitere Hydroxyzimtsäurederivate enthalten. Anhand der aufgeführten Gehalte ist das unterschiedliche Lösungsverhalten der Inhaltsstoffe in einem 70 %igen methanolischen Extrakt und in einem rein wässrigen Extrakt zu erkennen. Methanol löst eine Vielzahl der Inhaltsstoffe besser, was auch an der höheren antioxidativen Aktivität des methanolischen Extraktes zu erkennen war.

### 3.2.3 Isolierung von Verbindungen aus Holunderblüten

Um die Identität und Struktur der Hauptinhaltsstoffe der Holunderblüten zu bestätigen und deren antioxidative Kapazitäten zu bestimmen, wurden diese mittels HSCCC fraktioniert, anschließend mit präparativer HPLC isoliert und schließlich mittels NMR-Spektroskopie strukturell aufgeklärt. Weiterhin wurden die antioxidativen Aktivitäten der isolierten Verbindungen mittels TEAC bestimmt.

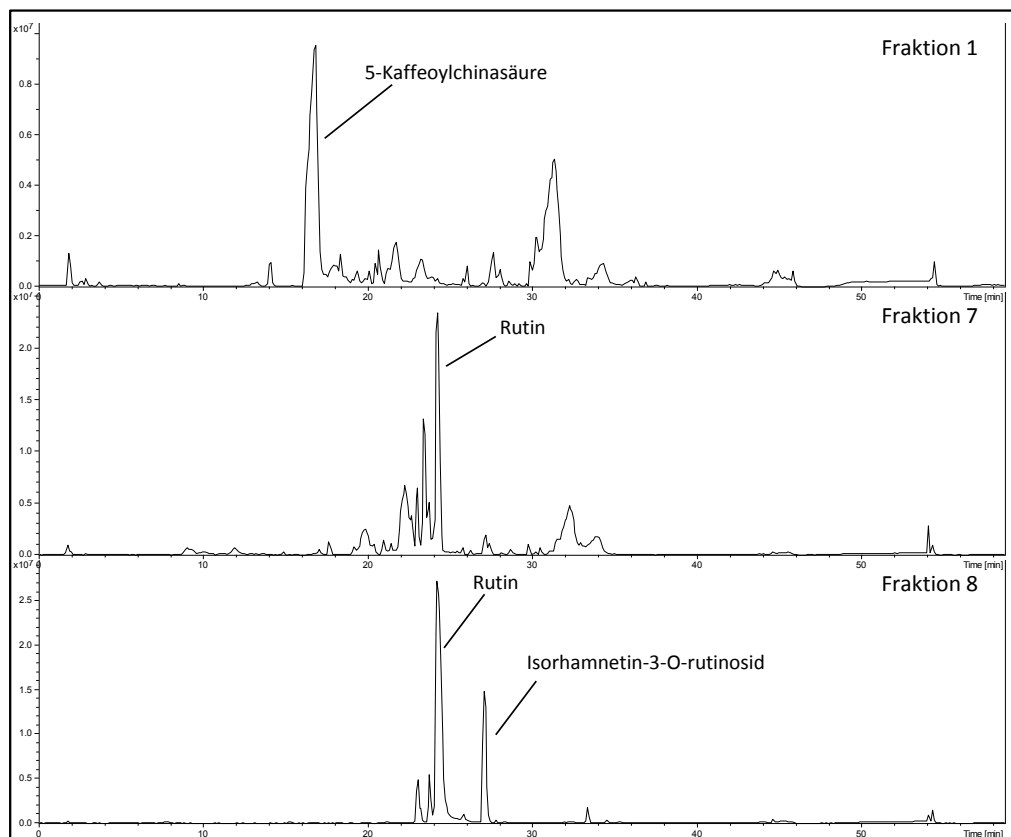
Für die Fraktionierung eines methanolischen Holunderblütenextraktes mittels HSCCC wurde dieser zunächst mittels XAD-7 aufgereingt. XAD-7 ist ein schwach polarer Acrylester für die Adsorptionschromatographie, mit dem es möglich ist, phenolische Verbindungen adsorptiv zu binden. Durch Waschen mit Wasser können hydrophile organische Säuren, Salze und Zucker entfernt werden. Der so aufgereinigte Extrakt wurde nach erfolgreicher Optimierung des Fließmittelsystems *tert*-Butylmethylether/Methanol/Wasser/Butanol (6/1,5/5/3,5; v/v/v/v) zur HSCCC eingesetzt.

Das UV-Chromatogramm, das bei 354 nm aufgenommen wurde, ist in **Abbildung 23** dargestellt.



**Abbildung 23:** HSCCC-Chromatogramm der „Hol CCC-1“ eines methanolischen XAD-7-Holunderblütenextraktes bei 354 nm

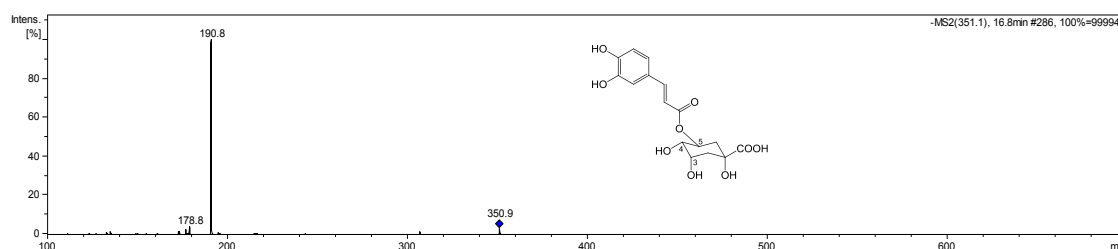
Anhand des UV-Chromatogramms konnten einschließlich der auf dem Coil retardierten Fraktion acht Fraktionen eingeteilt werden. In **Abbildung 24** sind die MS-Chromatogramme der Fraktionen 1, 7 und 8 dargestellt, aus denen die Hauptverbindungen isoliert wurden.



**Abbildung 24:** MS-Chromatogramme der Fraktionen 1, 7 und 8 der HSCCC-Trennung des XAD-7-Holunderblütenextraktes

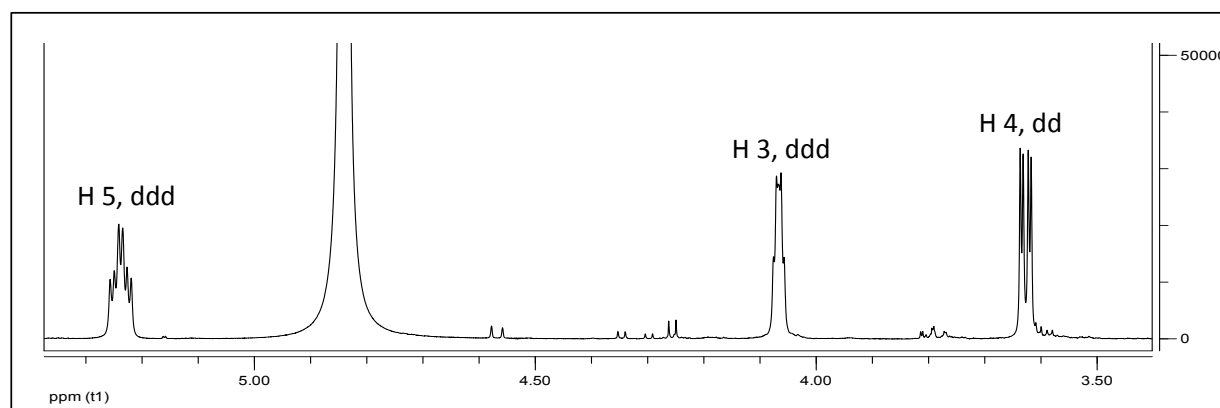
Die Methode der HSCCC konnte erfolgreich zur Isolierung von Hauptinhaltsstoffen aus Holunderblüten eingesetzt werden. Für die Isolierung der Reinsubstanzen waren weitere Trennungen mittels präparativer HPLC notwendig.

Fraktion 1 der HSCCC-Trennung enthielt zu etwa 30 % 5-Kaffeoylchinasäure (5-Chlorogensäure bzw. 5-CQA). Mit einem Gehalt von etwa 15600 mg/kg TS stellte das Hydroxyzimtsäurederivat einen Hauptinhaltsstoff der Holunderblüten dar. Mittels präparativer HPLC konnte diese anschließend erfolgreich isoliert werden. Die Molekülmasse der Chlorogensäure betrug im negativen Modus  $m/z$  353  $[M-H]^-$ . Mit Hilfe der nach CLIFFORD et. al. (2003) beschriebenen Fragmentierungsmuster zur Unterscheidung verschiedener Chlorogensäure-Isomere durch  $MS^n$ -Spektren konnte anhand des Hauptfragments  $m/z$  191 und des Fragments  $m/z$  179 mit einer geringeren Intensität, 5-Kaffeoylchinasäure identifiziert werden (**Abbildung 25**).



**Abbildung 25:**  $MS^2$ -Spektrum (neg. Modus) und Strukturformel von 5-Kaffeoylchinasäure

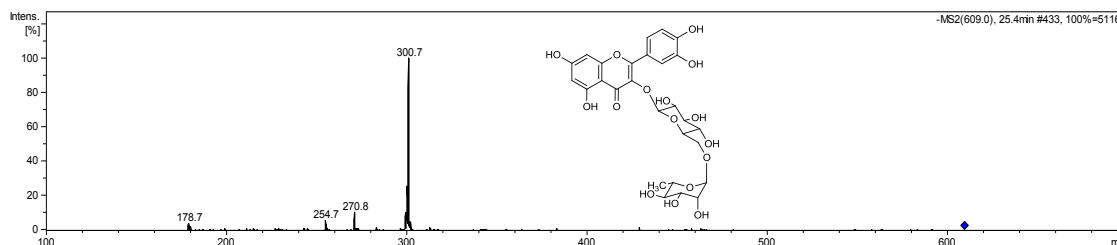
Zur weiteren Absicherung wurde die Struktur der Verbindung ebenfalls mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt und die Signale mit Literaturdaten verglichen. Bereits anhand der spezifischen Fragmentierungsmuster der einzelnen Chlorogensäure-Isomere konnten 3-CQA, 4-CQA und 5-CQA voneinander unterschieden werden. Bei der Strukturaufklärung mittels NMR kann man diese Isomere anhand der chemischen Verschiebungen und Kopplungsmuster der Protonen an den Positionen 3,4 und 5 der Chinasäure im  $^1H$ -NMR unterscheiden, da der Kaffeesäurerest -je nach Isomer- an den verschiedenen Positionen gebunden sein kann.



**Abbildung 26:** Ausschnitt des  $^1H$ -NMR-Spektrums der 5-Kaffeoylchinasäure (600 MHz,  $CD_3OD$ )

Die Signale des  $^1H$ -NMR-Spektrums belegen die Struktur der 5-Kaffeoylchinasäure (**Abbildung 26**) und stimmen mit den Angaben nach STOLL (2008) überein.

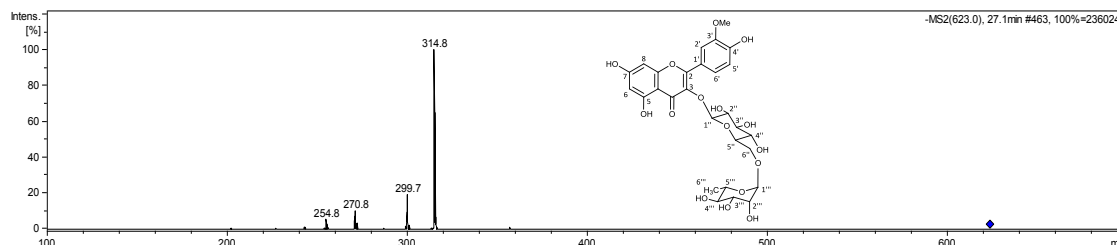
Als Hauptpeak in Fraktion 7 der HSCCC-Trennung konnte Quercetin-3-O-rutinosid anhand seines Fragmentierungsmusters identifiziert werden. Das Molekülion im negativen Modus bei  $m/z$  609  $[M-H]^-$ , das Fragment  $m/z$  301, das durch die Abspaltung des Zuckerrestes zu Stande kommt und die spezifischen  $MS^n$ -Fragmente des Quercetins bei  $m/z$  179 und  $m/z$  271 konnten dem Rutin zugeordnet werden (siehe **Abbildung 27**). Wie **Tabelle 1** zeigt, stellt Rutin mit etwa 20600 mg/kg TS eine der mengenmäßig wichtigsten Verbindungen in Holunderblüten dar.



**Abbildung 27:**  $MS^2$ -Spektrum (neg. Modus) und Strukturformel von Quercetin-3-O-rutinosid

Zur Absicherung wurde Rutin aus Fraktion 7 der „Hol-CCC-1“ Trennung isoliert und anschließend  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR-Spektren aufgenommen. Anhand des Vergleichs mit den NMR-Daten aus HILLEBRAND (2004) konnte eindeutig bestätigt werden, dass es sich bei der vorliegenden Verbindung um das Flavonol Quercetin handelt, an das an Position C3 eine Rutinose (Rhamnose und Glucose) gebunden ist (NMR-Daten in 5.4). Anhand des Vergleichs der Retentionszeiten der isolierten Substanz sowie Rutin als Standardsubstanz konnte ebenfalls bestätigt werden, dass es sich bei der isolierten Substanz um Rutin handelt.

Ein Hauptpeak in Fraktion 8 (Coil-Fraktion) setzte sich aus der Molekülmasse  $m/z$  625  $[M-H]^-$  und dem Fragmention  $m/z$  315 zusammen (**Abbildung 28**). Aus der Abspaltung von  $m/z$  309 lässt sich der Verlust einer Desoxyhexose ( $m/z$  146) und einer Hexose ( $m/z$  180), jeweils unter Anlagerung eines Wassermoleküls, ableiten. Aufgrund ihrer Häufigkeit in der Natur handelt es sich vermutlich wieder um eine Rutinose, die sich aus den Zuckern Rhamnose und Glucose zusammensetzt. Außerdem befindet sich im positiven Modus neben dem Pseudomolekülion  $m/z$  627  $[M+H]^+$  und dem durch Verlust der Zucker entstehenden Fragmention  $m/z$  317 auch ein Fragment mit der Masse  $m/z$  479. Auch hier lässt sich aus der Massendifferenz  $m/z$  146 die Abspaltung einer Rhamnose vermuten. Das Fragment  $m/z$  315 steht vermutlich für das Flavonol Isorhamnetin. Die Verbindung zeigt außerdem zwei Absorptionsmaxima bei 260 und 350 nm.



**Abbildung 28:**  $MS^2$ -Spektrum (neg. Modus) und Strukturformel von Isorhamnetin-3-O-rutinosid

Nach der Isolierung konnte anhand des Vergleichs mit den  $^1\text{H}$ -NMR-Daten aus CLARKSON et al. (2005) und HILLEBRAND (2004) die Struktur des Isorhamnetin-3-rutinosids abgesichert werden.

Anhand der Signale und der jeweiligen Kopplungskonstanten der Wasserstoffatome 2' ( $\delta$  7,85 ppm, d,  $J = 2,0$  Hz), 5' ( $\delta$  6,90 ppm, d,  $J = 8,4$  Hz) und 6' ( $\delta$  7,50 ppm, dd,  $J = 8,4, 1,9$  Hz) des B-Rings konnte Isorhamnetin als Aglykon der isolierten Verbindung bestätigt werden. Durch die schlechte Auflösung des  $^1\text{H}$ -NMR Spektrums erwies sich die Bestimmung des Zuckers als schwieriger und nicht alle Signale der Zucker konnten eindeutig zugeordnet werden. Während die Signale der Protonen H6''' ( $\delta$  0,99 ppm, d,  $J = 6,2$  Hz), H4''' ( $\delta$  3,05 ppm, dt,  $J = 4,7, 9,3$  Hz) und H6''b ( $\delta$  3,71 ppm, dd,  $J = 10,8, 1,9$  Hz) eindeutig zugeordnet werden konnten, fielen die Signale der Zucker-Protonen H5''', H5'', H3''', H3'', H2'', H6''a und H2''' in ein Multiplett zwischen 3,28-3,60 ppm. Allerdings konnten die anomeren Protonen der Glucose sowie der Rhamnose zugeordnet werden. Bei einer chemischen Verschiebung von 4,42 ppm lag das anomere Proton H1''' der Rhamnose als Dublett. Demzufolge handelte es sich um  $\alpha$ -L-Rhamnose. Bei  $\delta$  5,41 ppm lag das Dublett des anomeren Protons H1'' der Hexose. Die Kopplungskonstante von  $J = 7,4$  Hz wies auf  $\beta$ -D-Glucose hin. Anhand des zusätzlichen Vergleichs der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten und des Retentionszeitenvergleichs eines zuvor isolierten Standards konnten die Ergebnisse der  $^1\text{H}$ -Spektroskopie bestätigt werden. Da bereits CHRISTENSEN et al. (2008) Isorhamnetin-3-rutinosid als Inhaltsstoff in Holunderblüten nachgewiesen haben, bestätigte dies ebenfalls die erhaltenen Ergebnisse.

**Abbildung 56** zeigt die innerhalb des TEAC-Assays bestimmten antioxidativen Aktivitäten der isolierten Substanzen aus Holunderblüten.

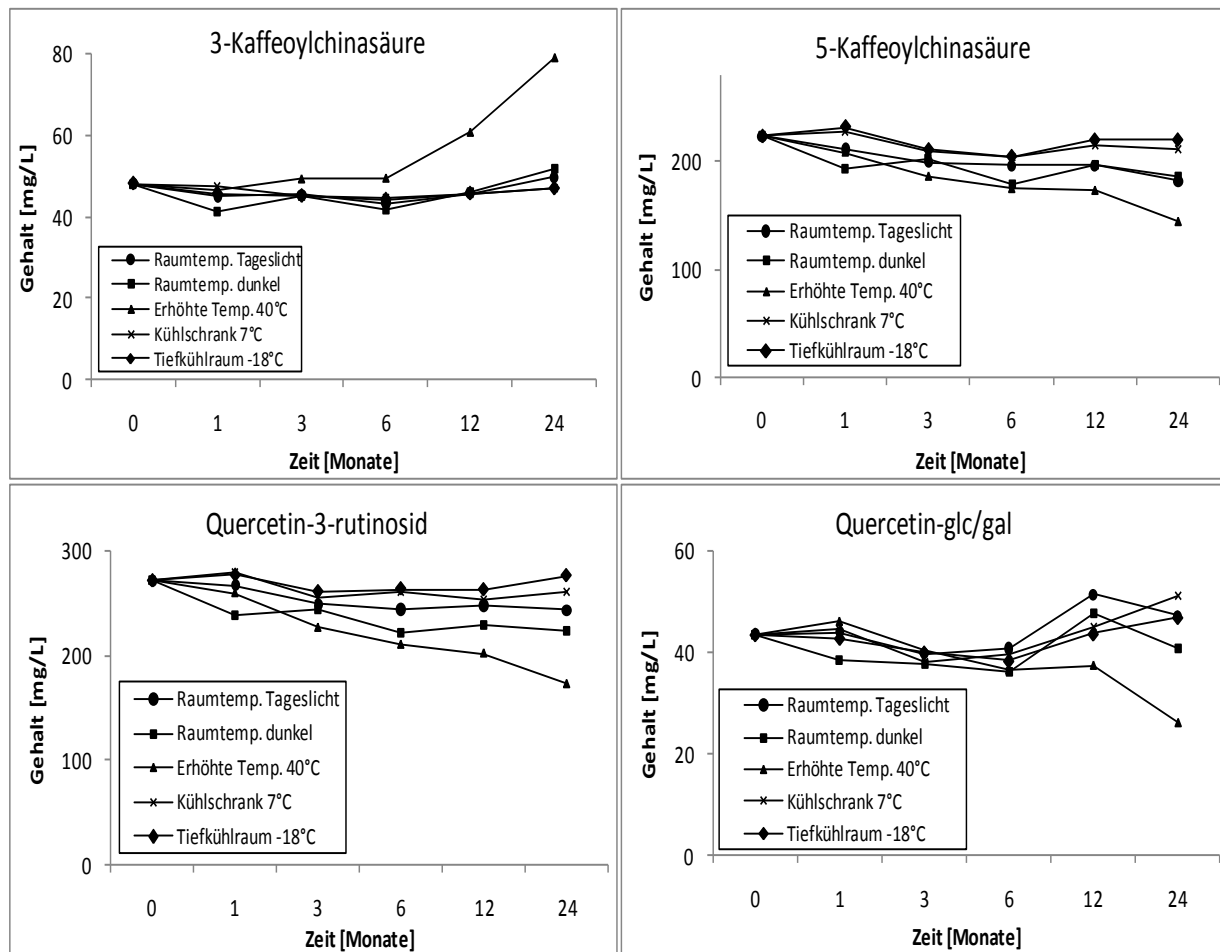
### 3.2.4 Untersuchungen zur Lagerstabilität eines Holunderblütengetränks

Ein von der Firma Plantextrakt rein wässrig hergestelltes Fertiggetränk aus Holunderblüten wurde zu Beginn, nach 1, 3, 6, 12 und 24 Monaten zur Bestimmung seines Flavonoidgehaltes mittels HPLC analysiert sowie mittels Folin-Ciocalteu-Test auf seinen Gesamtphenolgehalt geprüft.

Folgende Lagerbedingungen wurden dabei eingehalten:

- Lagerung bei Raumtemperatur, ohne Tageslichteinfluss (Lagerung in Dosen)
- Lagerung bei Raumtemperatur, mit Tageslichteinfluss (Lagerung in klaren Glasflaschen)
- Lagerung bei  $-18^\circ\text{C}$
- Lagerung bei  $7^\circ\text{C}$
- Lagerung bei  $40^\circ\text{C}$

**Abbildung 29** zeigt Diagramme der Gehalte der Hauptinhaltsstoffe zu Beginn, nach 1 Monat sowie nach 3 Monaten, 6, 12 und 24 Monaten Lagerzeit.



**Abbildung 29:** Gehalte der Hauptinhaltsstoffe eines Holunderblütenfertiggetränks während der Lagerung unter verschiedenen Bedingungen über 24 Monate

Anhand einiger ausgewählter Inhaltsstoffe des Fertiggetränks wurde die Veränderung während der Lagerung beobachtet. **Abbildung 29** zeigt die Veränderungen der Gehalte dieser Inhaltsstoffe über einen Zeitraum von 24 Monaten. 5-Kaffeoylchinasäure sowie Quercetin-3-rutinosid als Hauptinhaltsstoffe zeigten nur eine geringe Abnahme ihrer Gehalte. Lediglich während der Lagerung bei einer erhöhten Temperatur von 40°C war eine signifikante Abnahme beider Gehalte zu verzeichnen. Der Gehalt an 3-Kaffeoylchinasäure hingegen zeigte mit zunehmender Lagerdauer bei 40°C einen signifikanten Anstieg. Dies könnte für eine Umwandlung der 5-Kaffeoylchinasäure zur 3-Kaffeoylchinasäure bei einer erhöhten Temperatur sprechen. Der Gehalt des Quercetin-glucosids bzw. galactosids nahm innerhalb des ersten halben Jahres leicht ab, stieg dann nach einer Lagerdauer von 12 Monaten wiederum an, während der Rutingehalt während dieser Zeit stetig leicht abnahm. Möglicherweise kann der Anstieg des Gehaltes des Quercetin-glucosids/galactosids durch einen partiellen Abbau des Rutins erklärt werden. Bei der Lagerung eines Holunderbeerenmuttersaftes von Hillebrand (2004) wurde ebenfalls beobachtet, dass mit der Abnahme des Rutingehaltes der Gehalt des Quercetin-glucosids zunahm, was ebenfalls auf einen partiellen Abbau des Rutins hindeutete. Der stärkste Verlust war auch hier bei der Lagerung bei 40°C zu verzeichnen, was wieder die erhöhte Veränderung der Gehalte bei der Lagerung bei 40°C deutlich machte.



Die ermittelten Gesamtphenolgehalte aller unterschiedlich gelagerten Fertiggetränke wiesen keine signifikanten Veränderungen auf.

### 3.3 Studie zur Bioverfügbarkeit von Inhaltsstoffen aus Holunderblüten

Bislang liegen zur Biokinetik sowie zum Metabolismus, zur Distribution und Elimination von flavonoidhaltigen Produkten nach peroraler Aufnahme nur wenige Daten vor. Auch existieren bisher kaum Studien, bei denen ein direkter Vergleich der Bioverfügbarkeit von Flavonoiden aus einer aktiven Fraktion (isolierte Flavonoide) und aus einem praxisüblichen Aufguss (Extraktion der Flavonoide aus der Pflanzenmatrix) erfolgt ist (SAUTER, 2004). Eine aktuelle Literaturrecherche belegte, dass über Studien mit Holunderblüten bislang weder in-vitro- noch in-vivo-Ergebnisse veröffentlicht wurden.

Ziel dieser Studie sollte es sein, Metabolite sowie -sofern vorhanden- unveränderte Verbindungen im Plasma und Urin zu identifizieren und zu quantifizieren, und den Einfluss der beiden verschiedenen verabreichten Matrices auf die Bioverfügbarkeit zu untersuchen. Zusätzlich wurde die antioxidative Kapazität der flavonoidhaltigen Prüfprodukte im Plasma von der Kooperationsstelle in Hannover erfasst.

#### 3.3.1 Isolierung einer bioaktiven Fraktion zur Verabreichung an Probanden innerhalb der Humanstudie

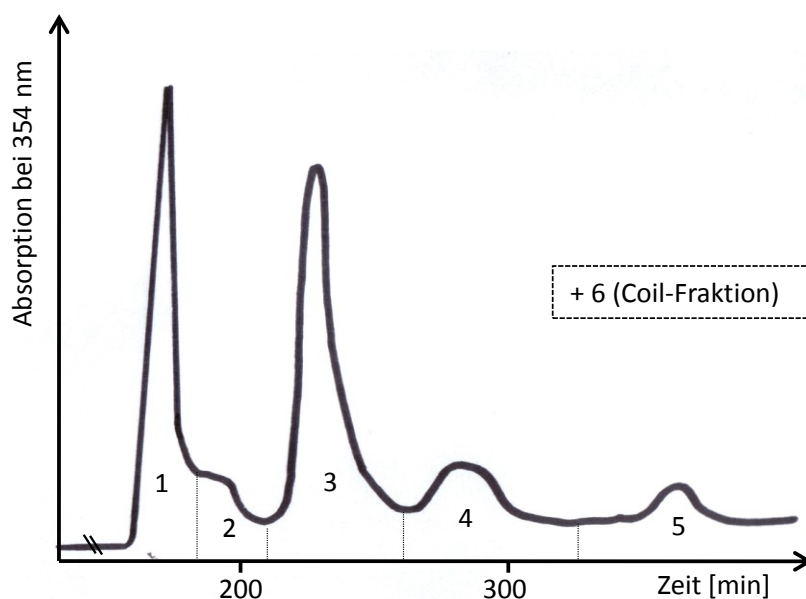
Zur Isolierung einer antioxidativen Fraktion aus Holunderblüten wurde ein 70 %iger methanolischer Extrakt hergestellt, mit Hexan zur Abtrennung unerwünschter lipophiler Substanzen ausgeschüttelt und anschließend gefriergetrocknet.

Für die Isolierung wurde die Trennung mittels HSCCC (high speed countercurrent chromatography) ausgewählt. Die HSCCC hat nicht nur die Vorteile einer schonenden und kostengünstigen Trennmethode, sondern bietet weiterhin eine hohe Probenbelastbarkeit, wobei durch die fehlende feste stationäre Phase nahezu 100 % der Probe zurückgewonnen werden können. Auch hier erfolgte die Entwicklung und Optimierung eines geeigneten Fließmittelsystems gemäß den Erläuterungen in 2.9.1.

Nach Testung verschiedener Fließmittelsysteme erwiesen sich folgende Systeme mit den angegebenen Verteilungskoeffizienten  $K$  als geeignet:

1. Ethylacetat/Butanol/Wasser (4,2/0,8/5; v/v/v) mit  $K = 0,91$
2. tert.-Butylmethylether/Butanol/Acetonitril/Wasser (4/2/3/10; v/v/v/v) mit  $K = 0,90$

**Abbildung 30** zeigt das HSCCC-Chromatogramm („Hol CCC-2“) der Trennung eines methanolischen Holunderblütenextraktes mit dem Fließmittel Ethylacetat/Butanol/Wasser (4,2/0,8/5; v/v/v) im Modus „head to tail“ (schwere Phase = mobile Phase, polare Verbindungen eluieren zu Beginn der Trennung). Die erhaltenen Fraktionen wurden gefriergetrocknet und anschließend mittels LC-MS analysiert.



**Abbildung 30:** HSCCC-Chromatogramm der „Hol CCC-2“ eines methanolischen Holunderblütenextraktes bei 354 nm zur Isolierung einer antioxidativen Fraktion

**Tabelle 2** zeigt die identifizierten Hauptverbindungen der einzelnen Fraktionen der HSCCC-Trennung und deren Ausbeuten in mg. Es wurden 1,08 g des gefriergetrockneten Extraktes für die Trennung eingesetzt.

**Tabelle 2:** Fraktionen und Ausbeuten in [mg] der „Hol CCC-2“

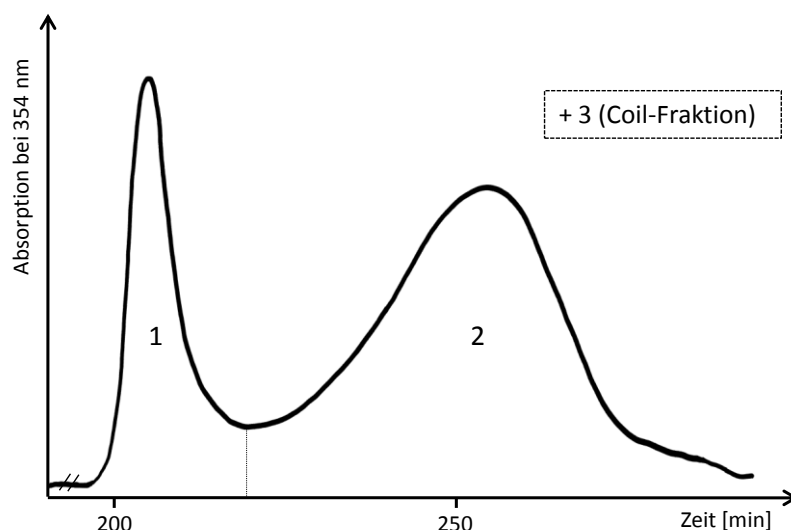
Fraktion	Identifizierte Verbindungen	Ausbeute [mg]
1	3-, 4- und 5-Kaffeoylchinasäure, 3-Feruloylchinasäure	720
2	5-Kaffeoylchinasäure	45
3	Quercetin-3-rutinosid	55
4	Isorhamnetin-3-rutinosid	24
5	Kämpferol-3-rutinosid	18
6 (Coil)	Quercetin-3-glc/gal, Isorhamnetin-glc/gal	73

Wie **Tabelle 2** zeigt, konnte mit Hilfe des Fließmittelsystems Ethylacetat/Butanol/Wasser (4,2/0,8/5; v/v/v) eine gute Trennung der Inhaltsstoffe erzielt werden.

Die aufgeführten geringen Ausbeuten in **Tabelle 2** zeigen allerdings, dass die durchgeführte HSCCC-Trennung für die Isolierung einer einzelnen antioxidativen Fraktion nicht geeignet war. Die Fraktionen 3 bis 6, welche interessante Flavonoide enthielten, besaßen lediglich Ausbeuten zwischen 18 und 73 mg, sodass für die Isolierung einer einzelnen antioxidativen Fraktion etwa 40 HSCCC-Trennungen nötig gewesen wären, um auf eine ausreichende Verabreichungsmenge für alle Probanden zu kommen. Fraktion 1, die hingegen eine Ausbeute von etwa 700 mg aufwies, beinhaltete ausschließlich Hydroxyzimtsäurederivate. Aus diesem Grund wurde anstelle des zuvor verwendeten head-to-tail

Modus der tail-to-head Modus eingesetzt, damit die unpolareren Flavonoide vor den polaren Hydroxyzimtsäurederivaten eluierten. Die leichte Fließmittelphase wurde als mobile Phase eingesetzt.

**Abbildung 31** zeigt ein Chromatogramm einer HSCCC-Trennung („Hol CCC-3“) bei 354 nm im Modus „tail to head“ mit dem Fließmittelsystem Ethylacetat/Butanol/Wasser (4,2/0,8/5; v/v/v).



**Abbildung 31:** HSCCC-Chromatogramm der „Hol CCC-3“ eines methanolischen Holunderblütenextraktes bei 354 nm zur Isolierung einer antioxidativen Fraktion

Es wurden 2 Fraktionen sowie die Coil-Fraktion erhalten, welche gefriergetrocknet und anschließend mittels LC-MS analysiert wurden. **Tabelle 3** zeigt die Inhaltsstoffe und Ausbeuten der einzelnen Fraktionen der HSCCC-Trennung.

**Tabelle 3:** Fraktionen und Ausbeuten in [mg] der „Hol CCC-3“

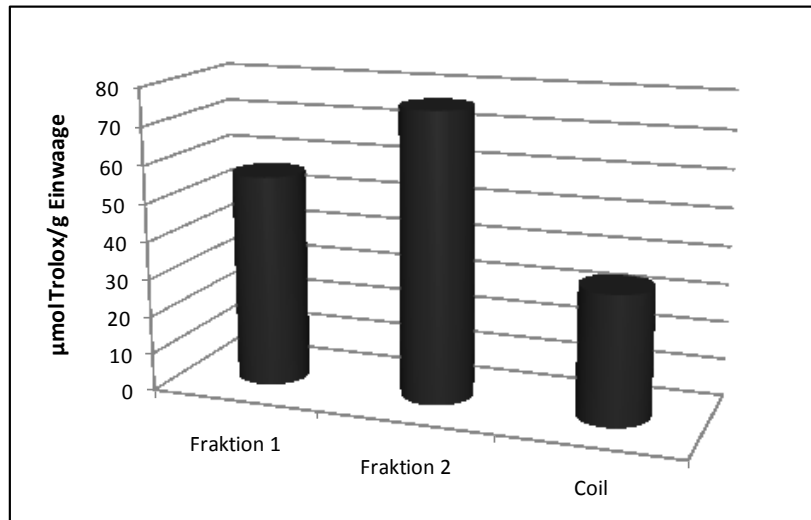
Fraktion	Identifizierte Verbindungen	Ausbeute [mg]
1	Quercetin-3-glucosid/galactosid Isorhamnetin-3-glucosid/galactosid Kämpferol-3-glucosid/galactosid di-Kaffeoylchinasäure	80
2	Quercetin-3-rutinosid 5-Kaffeoylchinasäure Isorhamnetin-3-rutinosid	120
Coil	3-, 4- und 5-Kaffeoylchinasäure 3-Feruloylchinasäure	730

Anhand der Tabelle ist zu sehen, dass die Trennung der Inhaltsstoffe wie erwartet nach steigender Polarität der einzelnen Verbindungen erfolgt ist. Während Fraktion 1 unpolarere Verbindungen enthält, sind in Fraktion 2 semipolare Verbindungen wie z.B. Rutin enthalten. Auf dem Coil verbleiben die polaren Hydroxyzimtsäurederivate, wobei auch bei dieser HSCCC-Trennung diese Fraktion die größte Ausbeute besitzt.

Dennoch sind die Auswaagen aufgrund der Verteilung der Probe auf nur 3 Fraktionen höher als bei den zuvor durchgeführten „head to tail“-Trennungen und eignen sich daher besser zur Isolierung einer antioxidativen Fraktion im großen Maßstab für die Humanstudie.

Um eine Aussage über die antioxidativen Kapazitäten der einzelnen Fraktionen treffen zu können, wurden diese mittels TEAC-Assay getestet.

**Abbildung 32** zeigt eine graphische Darstellung der antioxidativen Kapazitäten der HSCCC-Fractionen.



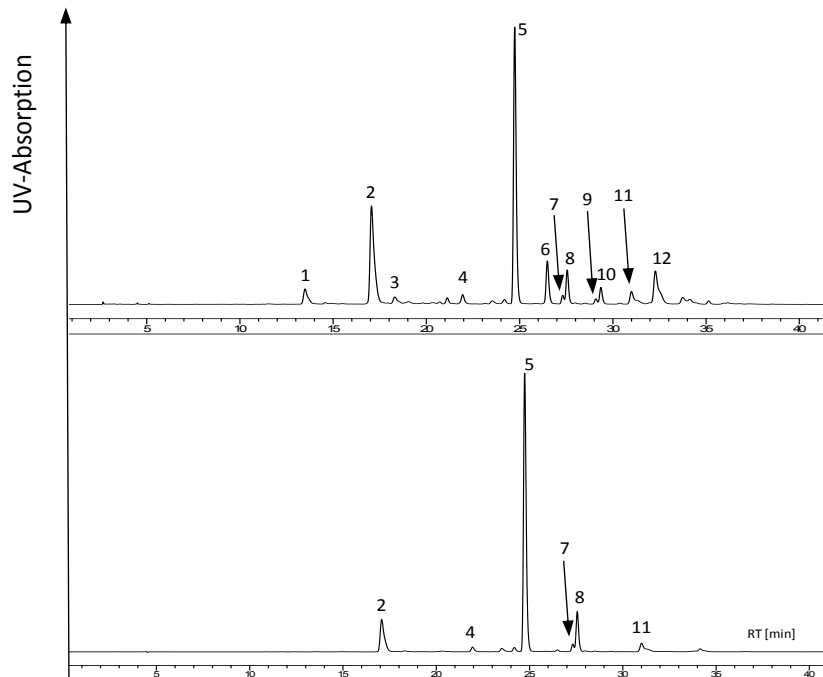
**Abbildung 32:** Antioxidative Aktivitäten der „Hol CCC-3“-Fraktionen in [µmol Trolox/g Einwaage]

Die Bestimmung der antioxidativen Aktivität der gefriergetrockneten Fraktionen ergab, dass Fraktion 2, welche als Hauptkomponenten Quercetin-3-rutinosid, 5-Kaffeoylchinasäure sowie Isorhamnetin-3-rutinosid enthält, die höchste antioxidative Aktivität besitzt. Die Coil-Fraktion besitzt die geringste antioxidative Kapazität, wobei zu beachten ist, dass diese Fraktion wiederum die höchste Ausbeute aller Fraktionen aufweist. Hauptinhaltsstoffe dieser Fraktion sind die Hydroxyzimtsäurederivate 3-, 4- und 5-Kaffeoylchinasäure. Aufgrund des in der Literatur mehrfach diskutierten positiven gesundheitlichen Effektes verschiedener Quercetinderivate (Abschnitt 2.4.2) sowie der höchsten antioxidativen Kapazität von Fraktion 2, wurde diese zur Verabreichung innerhalb der Humanstudie in größerem Maßstab isoliert.

Ausgehend von einem Gehalt an Rutin von etwa 200 mg in einem praxisüblichen Teeaufguss (10 g in 500 mL kochendem Wasser), wurden für die Humanstudie pro Proband 300 mg der antioxidativ wirksamen Fraktion 2 isoliert.

### 3.3.2 Polyphenolprofil des verabreichten Teeaufgusses sowie der isolierten bioaktiven Fraktion im Vergleich

**Abbildung 33** zeigt zum Vergleich das HPLC-Chromatogramm eines praxisüblichen Teeaufgusses (10 g Tee auf 500 mL Wasser) sowie das Chromatogramm eines Aufgusses der isolierten antioxidativen Fraktion (300 mg isolierte Fraktion auf 500 mL Wasser). Beide Aufgüsse wurden innerhalb der Humanstudie an 12 Probanden im cross-over-Design verabreicht.



**Abbildung 33:** HPLC-Chromatogramme des verabreichten Teegetränks (oben) und der isolierten antioxidativen Fraktion (unten) bei 354 nm

**Tabelle 4** zeigt die Gehalte der Hauptinhaltsstoffe beider Aufgüsse im Vergleich.

**Tabelle 4:** Gehalte der Hauptinhaltsstoffe des Teeaufgusses sowie der isolierten Fraktion in mg/L

Peak	Inhaltsstoff	R <sub>t</sub> [min]	Teeaufguss [mg/L]	Isolierte Fraktion [mg/L]
1	3-Kaffeoylchinasäure	13,5	31,1	0
2	5- Kaffeoylchinasäure	17,1	187,9	51,4
3	4- Kaffeoylchinasäure	18,3	12,2	0
4	3-Feruloylchinasäure	21,9	7,5	7,1
5	Quercetin-3-rutinosid	24,7	207,6	192,3
6	Quercetin-3-glucosid/galactosid	26,5	24,5	0
7	Kämpferol-3-rutinosid	27,2	3,2	1,2
8	Isorhamnetin-3-rutinosid	27,6	21,8	23,8
9	Kämpferol-3-glucosid/galactosid	29,1	0,9	0
10	Isorhamnetin-3-glucosid/galactosid	29,4	7,8	0
11	Quercetin-acetyl-glucosid	31,0	13,1	5,9
12	di-Kaffeoylchinasäure	32,2	101,2	0

### **3.3.3 Humanstudie zur Bioverfügbarkeit von Polyphenolen aus Holunderblüten im Blutplasma**

#### **3.3.3.1 Studiendesign, Studienablauf und Abnahmezeitpunkte**

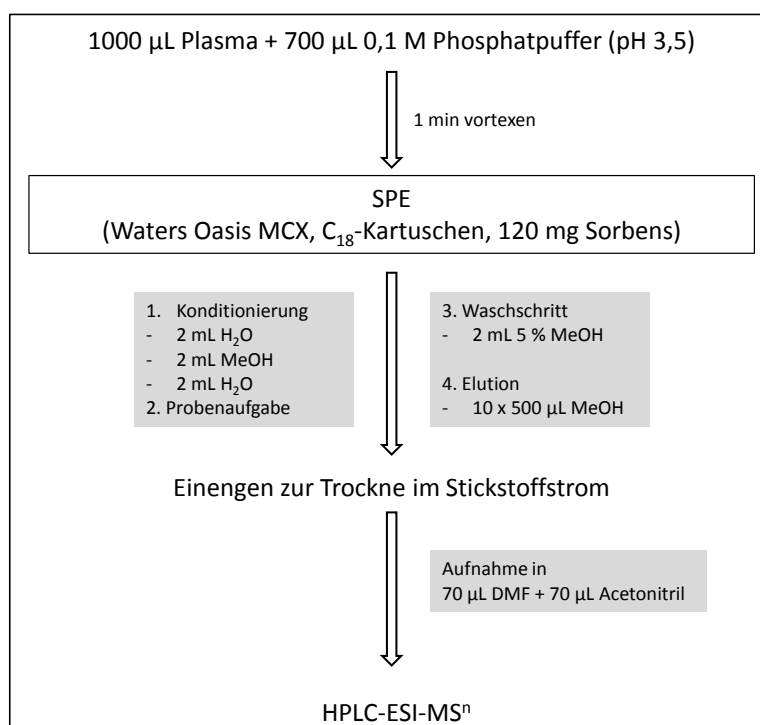
Die Studie wurde als placebokontrollierte, monozentrische, offene und vergleichende Cross-over-Studie durchgeführt. Sie umfasste drei separate Untersuchungsserien, in denen die verschiedenen Prüfprodukte placebokontrolliert an 12 männliche Probanden im Alter von 18-40 Jahren verabreicht wurden. Jede der drei Untersuchungsserien umfasste einen Zeitraum von vier Wochen. Einer zweiwöchigen Depletionsphase folgten drei Untersuchungstage, die von jeweils einwöchigen Auswaschphasen unterbrochen wurden, um eine gegenseitige Beeinflussung der Prüfprodukte auszuschließen. Während des gesamten Studienzeitraums mussten die Probanden auf den Konsum flavonoidhaltiger Lebens- und Genussmittel sowie die Einnahme flavonoidhaltiger Supplemente verzichten. Während des Untersuchungstages erhielten die Studienteilnehmer eine standardisierte Kost. Die Verabreichung der Prüfprodukte erfolgte im cross-over-Design. Durch Bildung von drei Untergruppen, die im Wechsel eines der Prüfprodukte inklusive Placebo erhielten, wurde sichergestellt, dass jeder Proband jedes Produkt konsumierte. Blutabnahmen erfolgten vor der Verabreichung des jeweiligen Prüfproduktes sowie 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 5 und 8 Stunden nach dem Konsum. Die Sammlung des Urins erfolgte vor der jeweiligen Verabreichung sowie nach 2; 4; 6; 8 und in Form einer Sammelprobe 8-24 Stunden nach Aufnahme der Prüfprodukte.

Die Daten zum Plasma- und Urinscreening wurden anhand von 9 Probanden ausgewertet, da 2 Probanden nicht an allen drei Studienterminen teilnahmen und die Proben eines weiteren Probanden zur Entwicklung und Optimierung einer geeigneten Aufarbeitungsmethode eingesetzt wurden.

#### **3.3.3.2 Methodenoptimierung zur Aufarbeitung von Plasmaproben**

Die am häufigsten in der Literatur beschriebenen Aufarbeitungsmethoden von Plasma sind einerseits Direktextraktionen mit verschiedenen Lösungsmitteln wie Ethylacetat, Dichlormethan, Aceton oder Methanol und andererseits Festphasenextraktionen an verschiedenem SPE-Material unter Verwendung unterschiedlicher Eluenten. Wie bereits in 2.4.1 beschrieben, besitzen Polyphenole wie Flavonoide eine hohe Affinität zum Plasmaprotein Albumin, wodurch Polyphenol-Protein-Komplexe entstehen, welche die Analytik stören können. Da Polyphenole in einer solchen komplexierten Form für die Analytik mittels LC-ESI-MS<sup>n</sup> nicht zugänglich sind, muss mit Hilfe einer vorangeschalteten Aufarbeitung die Protein-Polyphenol-Bindung gespalten werden. In der Analytik werden Säuren wie o-Phosphorsäure, Salzsäure oder Essigsäure oder organische Lösungsmittel wie Methanol oder Dimethylformamid zur Proteinfällung eingesetzt.

Nach ROURA et al. (2005) ist die Aufarbeitung mittels Festphasenextraktion eine erfolgreiche Methode zur Identifizierung von Metaboliten in Plasma. Angelehnt an diese Methode, wurde eine Aufarbeitungsmethode entwickelt, die nach Testung verschiedenster SPE-Materialien (Waters Oasis MCX-, HLB- und WCX-Kartuschen) und Eluentenmischungen im folgenden Aufarbeitungsschema endete:



**Abbildung 34:** Optimierte Plasmaaufarbeitung mittels Festphasenextraktion an kombiniertem RP-Material

Nachdem anhand von Nüchternplasma-Proben, denen als interne Standards Quercetinglucuronid und Gallussäure zugesetzt wurden, in den Vortests gute Wiederfindungsraten von etwa 80-90 % ermittelt wurden, erwiesen sich die Tests mit authentischen Plasma-Proben als problematischer. Die Chromatogramme zweier identisch aufgearbeiteter Plasmaaliquote wiesen signifikante Unterschiede in ihrer Zusammensetzung auf, sodass die Chromatogramme der gleichen Plasma-Probe nicht miteinander verglichen werden konnten. Aufgrund dieser unzureichenden Reproduzierbarkeit der Methode wurde eine Fehleranalyse aller in der Methode vorkommenden Schritte durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass im Wascheluat Zielverbindungen nachgewiesen werden konnten, was auf eine unzureichende Bindung der Zielkomponenten an das SPE-Material hindeutete. Eine weitere Ursache könnte eine unzureichende Spaltung der Polyphenol-Protein-Bindung aufgrund eines zu geringen Volumens an Phosphat-Puffer sein. Allerdings war auch nach weiteren Optimierungsschritten (Verwendung verschiedener SPE-Materialien, Erhöhung des Volumens des Phosphatpuffers, Veränderungen der Waschschriftkonditionen u. a.) keine Verbesserung der Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit der Identifizierung von Metaboliten zu verzeichnen. Ein weiterer Nachteil der Festphasenextraktion war die zeitaufwendige Durchführung, da maximal 6 Plasma-Proben nebeneinander aufgearbeitet werden konnten, was eine Bearbeitung einer solch hohen Probenzahl nahezu unmöglich machte.

Aufgrund dessen wurde der Vorteil der weniger zeitaufwendigen Probenaufarbeitung durch eine Direktextraktion genutzt und die Aufarbeitung dahingehend variiert. Da das Plasma eine hohe Proteinkonzentration aufweist, die zu Polyphenol-Protein-Bindungen führt, ist eine Aufarbeitung notwendig, die eine vollständige Eiweißfällung beinhaltet. Auch wurden in der Vergangenheit Aufarbeitungsmethoden verwendet, die eine solche Proteinfällung nicht beinhalteten wie beispielsweise die Direktextraktion mit Ethylacetat. Ausschlaggebend für die Identifizierung von Metaboliten sowie unveränderten Verbindungen in authentischen Plasma-Proben ist eine Spaltung der

Protein-Polyphenol-Bindung, die durch Säurezusatz erzielt werden kann. In den durchgeführten Tests erwies sich ein Phosphat-EDTA-Puffer mit einem pH-Wert von 3,5 als geeignet und wurde für alle nachfolgenden Aufarbeitungen verwendet.

Zur Entwicklung einer Methode mittels Direktextraktion des Plasmas wurden anhand verschiedener Literaturstellen zwei Varianten getestet:

1. Direktextraktion des Plasmas mit Ethylacetat (LEE et al., 1995)
2. Direktextraktion des Plasmas mit Ethylacetat nach vorangegangener Fällung mit Methanol (VAN AMELSVOORT et al., 2001), Acetonitril (MULLEN et al., 2004) oder Dimethylformamid (ZIMMERMANN et al., 2009) bzw. eine Direktextraktion mit einem Lösungsmittelgemisch, das Ethylacetat beinhaltet.

Um die unterschiedlichen Vorgehensweisen zu testen, wurden die Methoden variiert und folgende Direktextraktion jeweils abgewandelt nach dem Schema in **Abbildung 36** durchgeführt:

- 2 x Direktextraktion mit Methanol
- 2 x Direktextraktion mit Ethylacetat
- 1 x Direktextraktion mit Acetonitril
1 x Direktextraktion mit Methanol
- 1 x Direktextraktion mit Acetonitril
1 x Direktextraktion mit Ethylacetat
- 1 x Direktextraktion mit Ethylacetat/Methanol (1:1, v/v)
- 1 x Direktextraktion mit Ethylacetat
- 1 x Direktextraktion mit Methanol/Dimethylformamid (1:1, v/v)
- 1 x Direktextraktion mit Ethylacetat
- 2 x Direktextraktion mit Methanol/Ethylacetat (3:2, v/v)
- 2 x Direktextraktion mit Methanol/Ethylacetat (3:1, v/v)
- 2 x Direktextraktion mit Methanol/Ethylacetat (2:3, v/v)
- 2 x Direktextraktion mit Methanol/Ethylacetat (1:3, v/v)

Dazu wurde Nüchternplasma mit einem Mischstandard aus Holunderblüteninhaltsstoffen wie Quercetin-3-rutinosid und 5-Kaffeoylchinasäure bzw. einem möglichen Metabolit wie Quercetinglucuronid versetzt, die verschiedenen Aufarbeitungen durchgeführt und die Wiederfindungsraten anhand der Flächeninhalte ermittelt. Im verwendeten Nüchternplasma konnte innerhalb der Vorstudien keine der genannten Referenzsubstanzen nachgewiesen werden. Für die Vergleichbarkeit der variierten Methoden wurden alle verwendeten Volumina (z.B. auch zur Wiederaufnahme des Rückstandes nach dem Einengen zur Trockne) konstant gehalten. Die Konzentration des Mischstandards bewegte sich dabei im Bereich des zu erwartenden Höchstgehaltes von Flavonoiden in Plasma bei etwa 50 mg/L. Zum Schutz vor autoxidativen Prozessen sowie zur Stabilisierung der Polyphenole wurde der eingeeengte Rückstand zusätzlich mit einer 1%igen Ascorbinsäurelösung versetzt.

Als Methode der Wahl erwies sich die 2-fache Direktextraktion im ersten Teil mit einem Gemisch aus Ethylacetat/Methanol (1:1, v/v) und einer anschließenden zweiten Extraktion mit Ethylacetat.



Im ersten Schritt wurden die Polyphenole in Kombination mit dem Puffer von den Proteinen gelöst und diese in Gegenwart von Methanol denaturiert und schließlich ausgeflockt. Durch die 2-fache Extraktion konnten insgesamt Wiederfindungsraten zwischen 83 und 93 % für die einzelnen eingesetzten Standards erzielt werden.

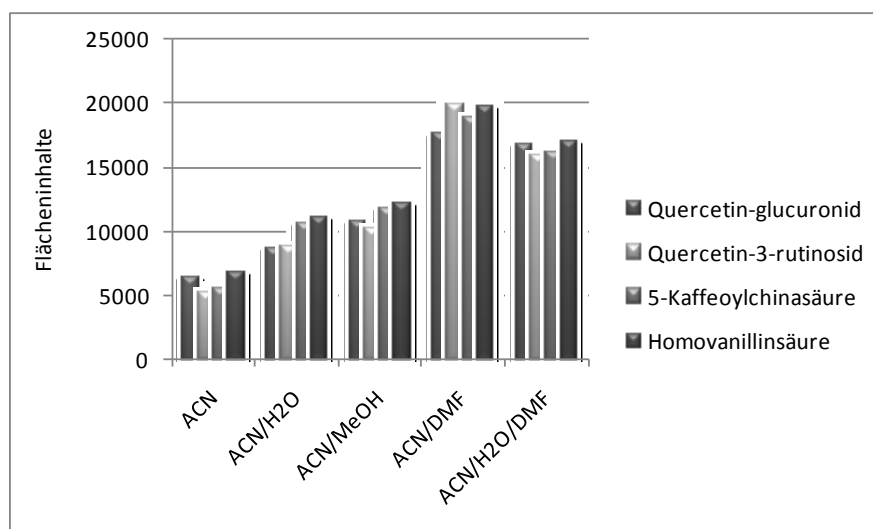
Für die Ermittlung der Wiederholpräzision der Methode wurden 6 Aliquote einer Plasmaprobe mit einem internen Standard versetzt und identisch nach dem Schema in **Abbildung 36** aufgearbeitet. Nach Erfassung der Flächeninhalte der Standardverbindungen ergab sich eine durchschnittliche Abweichung von etwa 5 %.

Auch die Bedingungen der Aufnahme des Rückstandes nach dem Einengen zur Trockne spielten eine große Rolle. Zur Evaluierung eines geeigneten Lösungsmittels bzw. Lösungsmittelgemischs wurden verschiedene Varianten getestet:

Aufnahme in:

- 100 µL Acetonitril
- 70 µL Acetonitril + 70 µL Nanopure®
- 70 µL Acetonitril + 70 µL Methanol
- 70 µL Acetonitril + 70 µL Dimethylformamid
- 50 µL Acetonitril + 50 µL Nanopure® + 50 µL Dimethylformamid.

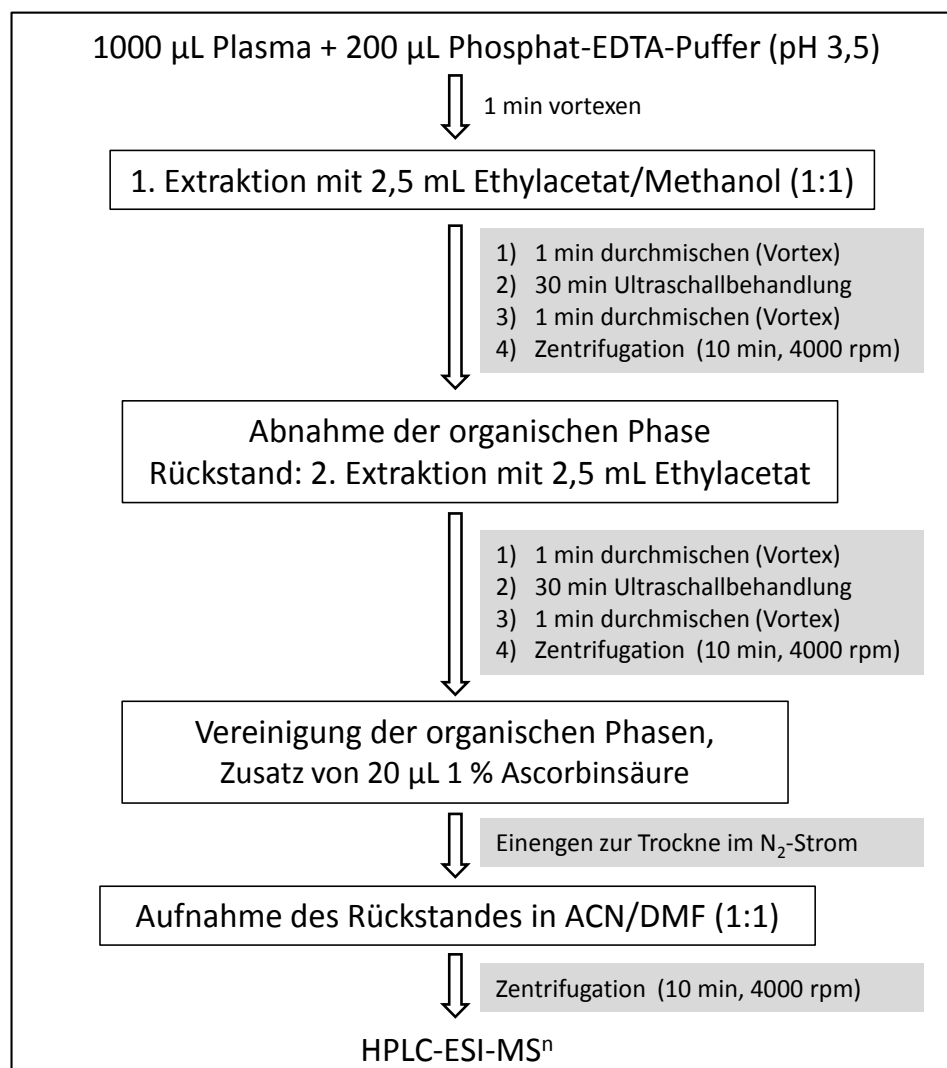
Dazu wurden Nüchternplasmaproben mit einem Mischstandard aus Quercetinglucuronid, Quercetin-3-rutinosid, 5-Kaffeoylchinasäure und Homovanillinsäure versetzt, aufgearbeitet und bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in den aufgeführten unterschiedlichen Lösungsmittelgemischen aufgenommen. Gemessen an den jeweiligen Flächeninhalten ergab sich folgendes Diagramm:



**Abbildung 35:** Ausbeuten des Mischstandards nach Aufnahme des Plasmarrückstandes in verschiedenen Lösemittelgemischen

In **Abbildung 35** ist unter anderem zu sehen, dass der Einsatz des universellen polar aprotischen Lösungsmittels Dimethylformamid eine deutliche Steigerung der Ausbeuten bewirkt. Im Gegensatz zur Kombination aus Acetonitril, Wasser und Dimethylformamid zeigt die Kombination aus Acetonitril und Dimethylformamid eine deutlich verbesserte Löslichkeit der Komponenten.

Resultierend aus den beschriebenen Optimierungsschritten bezüglich Extraktionsmethode, Säurezugabe, Aufnahme des Rückstands u.a. ergab sich das folgende Aufarbeitungsschema:



**Abbildung 36:** Optimierte Aufarbeitungsschema der Direktextraktion von Plasma

Für die gezielte Suche nach möglichen Metaboliten der Inhaltsstoffe aus Holunderblüten war es notwendig, alle möglichen Phase-I- und II-Metabolite zusammenfassend aufzulisten und darzustellen. Die erarbeitete Datenaufstellung zur Erfassung möglicher Metabolite enthielt alle wichtigen in Holunderblüten vorkommenden Flavonoide. Zusätzlich waren dort molekulare Massen von Metaboliten aufgeführt, die aus diesen Verbindungen während des Metabolismus entstehen konnten wie beispielsweise Glucuronide, Sulfate, Methylierungsprodukte oder auch Ringspaltungsprodukte wie Phenylelessigsäuren und Benzoesäuren. Anhand dieser Datenaufstellung konnte nach mehr als 100 Verbindungen anhand ihrer Massen gezielt gesucht werden.

Ein Großteil der Literaturdaten zeigen, dass die Aufarbeitung von Plasmaproben zumeist mittels enzymatischer Spaltung der Metabolite durchgeführt wird, denn oft können Metabolite wie Glucuronide, Sulfate oder methylierte Verbindungen nicht detektiert und somit nicht identifiziert werden. Aus diesem Grund gibt es vorrangig Daten zur Bioverfügbarkeit der abgespaltenen Aglykone, wie z.B. Quercetin aus verschiedenen verabreichten Pflanzenextrakten oder Quercetinglykosiden,

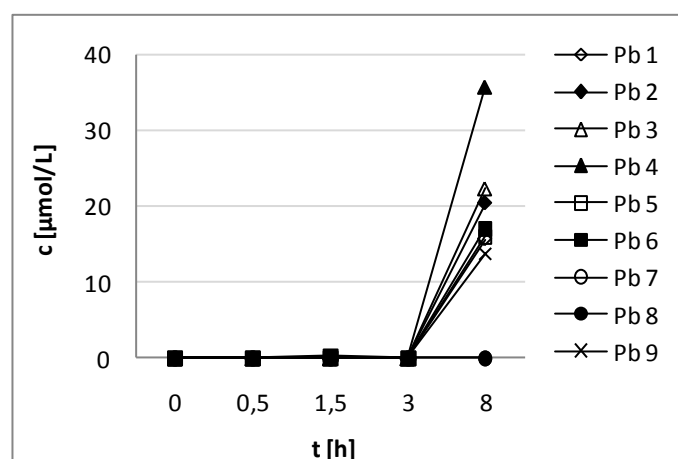
ohne dass die tatsächlich im Blut oder Urin vorkommenden Metabolite identifiziert werden. Das Hauptaugenmerk innerhalb dieser Arbeit war es daher, die intakten Metabolite aus den verabreichten Aufgüssen mit Hilfe der verwendeten Methode zu identifizieren. Um auszuschließen, dass eventuell auftretende Metabolite durch die Methode nicht erfasst werden konnten, wurden einige Stichproben vor der Direktextraktion einer enzymatischen Spaltung mittels Glucuronidase sowie Sulfatase unterzogen und weiterhin nach dem Schema in **Abbildung 36** aufgearbeitet. Festzustellen war, dass auch nach der enzymatischen Behandlung der Proben qualitativ als auch quantitativ keine weiteren Metabolite bzw. Aglykone detektiert werden konnten.

### 3.3.3.3 Ergebnisse des Plasmascreenings

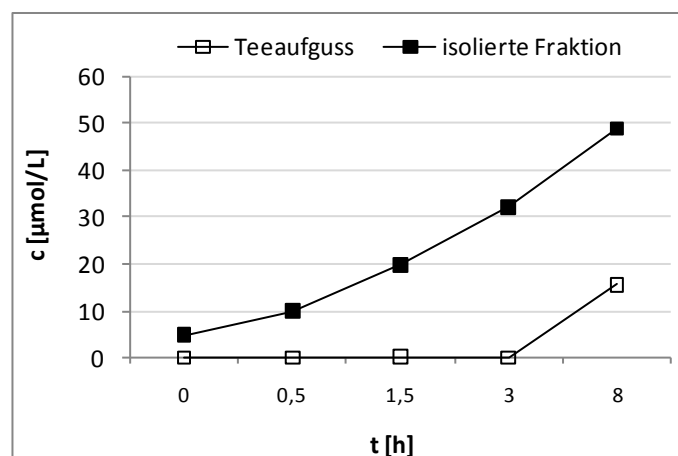
#### 3.3.3.3.1 Plasmakonzentrationen von Chinasäure

Die Molekülionenmasse von  $m/z$  192 mit den Fragmenten  $m/z$  173 sowie  $m/z$  111 konnte anhand der Retentionszeit von 7,0 min eindeutig der Chinasäure zugeordnet werden. Sieben von neun Probanden zeigten ein Konzentrationsmaximum 8 h nach der Applikation des Tees (**Abbildung 37**). Hingegen konnte Chinasäure bei zwei Probanden nicht nachgewiesen werden.

**Abbildung 38** stellt die durchschnittlichen Plasmaspiegel der 9 Probanden nach Applikation des Tees sowie der antioxidativen Fraktion dar. Während nach der Applikation des Tees eine Erhöhung der Plasmakonzentration deutlich verzögert erst 8 h nach Verabreichung beobachtet wurde, war nach Applikation der antioxidativen Fraktion bereits nach 0,5 h eine Konzentrationserhöhung zu erkennen. Da sowohl vor Verabreichung der Fraktion als auch nach Verabreichung des Placebos bereits geringe Konzentrationen nachweisbar waren, wurde der Mittelwert daraus von den ermittelten Konzentrationen aller Zeitpunkte abgezogen. Nach Applikation des Tees ergaben sich maximale Plasmaspiegel von  $15,66 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  und nach Gabe der antioxidativen Fraktion  $48,91 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Eine Übersicht über die einzelnen durchschnittlichen sowie maximalen und minimalen Plasmakonzentrationen zum jeweiligen Abnahmezeitpunkt sind im Anhang in 7.3.1 aufgeführt.



**Abbildung 37:** Mittels HPLC-ESI-MS ermittelte Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{mol/L}$ ] von Chinasäure nach Applikation von Holunderblütentee der Probanden 1-9



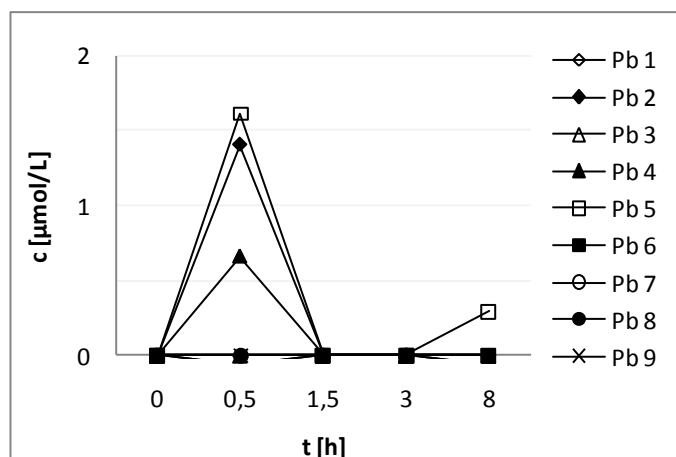
**Abbildung 38:** Mittels HPLC-ESI-MS ermittelte durchschnittliche Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{mol/L}$ ] von Chinasäure nach Applikation von Holunderblütentee sowie einer daraus isolierten antioxidativen Fraktion ( $n=9$ )

Es ist anzunehmen, dass die Anwesenheit von Chinasäure im Plasma der Probanden von den im Teeaufguss und isolierter Fraktion enthaltenen Chlorogensäuren herrührt. KAHLE (2008) zeigte, dass in einem simulierten Duodenalsekret bei pH 7,2 aus 5-Kaffeoylchinasäure 3- und 4-Kaffeoylchinasäure, Kaffeesäure sowie Chinasäure generiert wurden. Da in beiden Verabreichungsformen eine hohe Konzentration an 5-Kaffeoylchinasäure enthalten war, war davon auszugehen, dass Chinasäure ein Hydrolyseprodukt der 5-Kaffeoylchinasäure ist. Interessant war, dass nach Applikation der isolierten Fraktion, welche zwar im Vergleich zum Teeaufguss weniger der 5-Kaffeoylchinasäure enthielt, beachtlich höhere Plasmaspiegel nachweisbar waren. In diesem Fall könnte die Matrix beider Aufgüsse eine wichtige Rolle gespielt haben. Während im Teeaufguss eine Vielzahl verschiedener Verbindungen enthalten ist, ist die Matrix der isolierten Fraktion deutlich weniger komplex zusammengesetzt. Dies führt zu der Annahme, dass Metabolite der 5-Kaffeoyl-chinasäure bei einer weniger komplex zusammengesetzten Matrix eine höhere Bioverfügbarkeit besitzen, als deren Analoge in einem komplex zusammengesetzten Lebensmittel. Die bisherigen Literaturdaten geben dazu eher widersprüchliche Aussagen. Bezogen auf das Flavonol-O-glykosid Quercetin-3-rutinosid beschrieben GRAEFE et al. (2001) beispielsweise nach Verabreichung eines Buckwheat Tees höhere bioverfügbare Konzentrationen an Rutin als aus einem vergleichbaren Extrakt, der aus reinem isoliertem Rutin bestand. SCHILCHER und HAGELS (1996) führten eine weitere Studie durch, die sich mit einer 3-tägigen Gabe von Rutin sowie Buchweizenextrakten im Vergleich beschäftigte. Aus dieser Studie ging ebenfalls hervor, dass Rutin aus dem Buchweizenkraut signifikant besser resorbiert wurde als reines Rutin. Ähnliche Vergleiche zur Bioverfügbarkeit von 5-Kaffeoyl-chinasäure aus verschiedenen Matrices gibt es in der Literatur nicht, da deren Bioverfügbarkeit meist nur nach Verabreichung von Kaffee untersucht wurde.

### 3.3.3.3.2 Plasmakonzentrationen von Dihydroferulasäure

Das Pseudomolekülion  $m/z$  195  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , die Fragmentionen  $m/z$  179 und  $m/z$  134 sowie eine Retentionszeit von 23,2 min belegten die Identität der Dihydroferulasäure. Nachweisbar war diese Verbindung nach Applikation des Teeaufgusses lediglich bei drei von neun Probanden. Bei diesen drei Probanden war das Konzentrationsmaximum bereits 0,5 h nach Verabreichung erreicht, wie **Abbildung**

**39** zeigt. Das durchschnittliche Konzentrationsmaximum aller neun Probanden lag bei  $0,40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Nach Verabreichung der antioxidativen Fraktion war keine Dihydroferulasäure im Plasma nachweisbar.

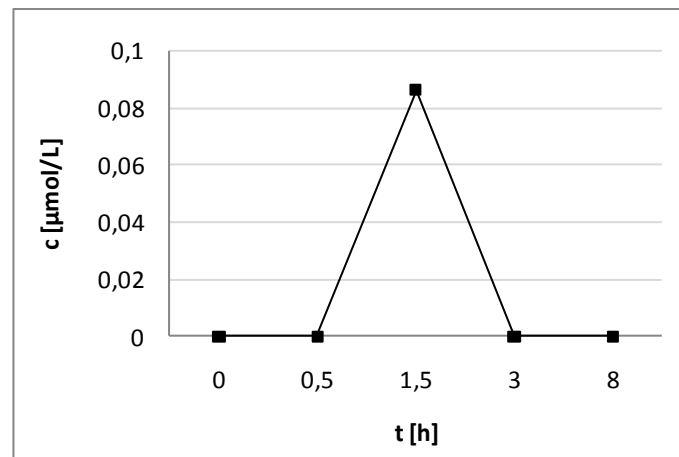


**Abbildung 39:** Mittels HPLC-ESI-MS ermittelte Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{mol/L}$ ] von Dihydroferulasäure nach Applikation von Holunderblütentee der Probanden 1-9

Nach WITTEMER (2003) entstehen aus 5-Kaffeoylchinasäure Kaffeesäure und Chinasäure. Durch Methylierung der Kaffeesäure kann Ferulasäure oder Isoferulasäure im Körper gebildet werden. Ebenfalls kann Ferulasäure aus einer Feruloylchinasäure durch Hydrolyse freigesetzt werden. KAHLE (2008) bestätigte anhand frisch isolierter Hepatozyten der Ratte, dass in der Leber aus Kaffeesäure Ferulasäure entsteht. Dihydroferulasäure wiederum kann durch Reduktion der Ferulasäure entstehen. Aufgrund der sehr geringen Konzentration an Feruloylchinasäure im Teeaufguss wird davon ausgegangen, dass die hier auftretende Ferulasäure (siehe Abschnitt 3.3.3.3) als Metabolit der 5-Kaffeoylchinasäure gebildet wurde, da der Teeaufguss einen großen Gehalt an 5-Kaffeoylchinasäure aufweist. Das frühe Konzentrationsmaximum deutet auf eine Absorption im oberen Dünndarm hin. Nur bei drei der neun Probanden konnte Dihydroferulasäure nachgewiesen werden, was auch hier die sehr hohen interindividuellen Unterschiede innerhalb der einzelnen Probanden zeigt. Die meisten der bislang durchgeführten Studien beschrieben ebenfalls sehr hohe interindividuelle Unterschiede (GRAEFE et al., 2001; MANACH et al., 1998; MOON et al., 2000). Neben äußeren Faktoren, wie z.B. dem Gewicht eines Probanden, sind die großen Schwankungen zwischen den Probanden vermutlich auf die individuelle Beschaffenheit der körpereigenen Enzyme und Mikroorganismen zurückzuführen.

### 3.3.3.3 Plasmakonzentrationen Ferulasäure

In Plasma von drei der neun Probanden konnte Ferulasäure identifiziert werden. Eindeutig konnte dies durch die Molekülionienmasse  $m/z$  194 und das Fragment  $m/z$  134 sowie durch eine Retentionszeit von 24,9 min identifiziert werden. Alle drei der positiven Probanden zeigten eine maximale Konzentration 1,5 h nach Verabreichung des Tees. Der anhand aller neun Probanden ermittelte durchschnittliche Plasmaspiegel lag bei  $0,09 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , während die maximale Plasmakonzentration der drei positiven Probanden bei  $0,26 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  lag. **Abbildung 40** zeigt die durchschnittliche Plasmakonzentration der neun Probanden von Ferulasäure nach der Verabreichung des Holunderblütentees.

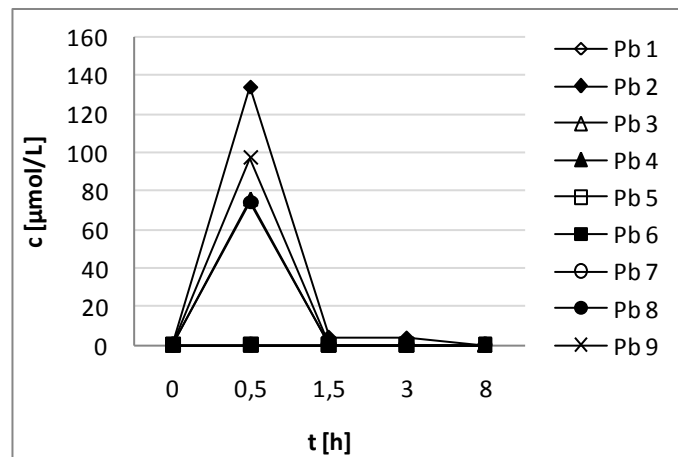


**Abbildung 40:** Mittels HPLC-ESI-MS ermittelte durchschnittliche Plasmakonzentrationen [µmol/L] von Ferulasäure nach Applikation von Holunderblütentee (n=9)

Auch WITTEMER (2003) beschrieb nach der Verabreichung eines Artischockenblätterextraktes mit einem hohen Gehalt an Kaffeoylchinasäuren die systemische Verfügbarkeit von Ferulasäure. Auch dort konnten maximale Plasmaspiegel bereits nach 1 h festgestellt werden. Dieser Phase-I-Metabolit konnte bislang nur von WITTEMER (2003) im Plasma identifiziert werden, während andere Studien diesen lediglich im Urin nachweisen konnten (RECHNER et al., 2001, MONTEIRO et al., 2007). Den Ergebnissen nach zu urteilen, ist es wahrscheinlich, dass nach oraler Applikation die Kaffeoylchinasäure vermutlich im Dünndarm einer Esterspaltung unterlag und daraus Kaffee- sowie Chinasäure entstanden. Da Ferulasäure bereits im Plasma identifiziert werden konnte, muss die Methylierung der Kaffeesäure zur Ferulasäure bereits vor dem Nierengewebe erfolgt sein. Möglich ist, dass die Methylierung bereits im Enterozyten des Darms oder in der Leber stattfand. In verschiedenen Studien konnten bereits in Darm und Leber Methylierungen durch Catechol-O-methyltransferasen nachgewiesen werden (KUHNLE et al., 2000; MORIDANI et al., 2002).

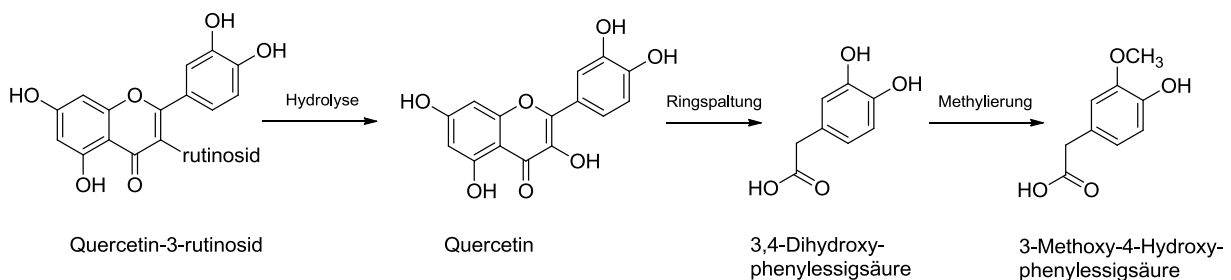
#### 3.3.3.3.4 Plasmakonzentrationen von Homovanillinsäure

Als weiterer Metabolit konnte im Plasma von vier Probanden 3-Methoxy-4-Hydroxy-Phenyllessigsäure (Homovanillinsäure) anhand seines Pseudomoleküliions  $m/z$  182  $[M-H]^-$  und seines Fragments im  $MS^2$ -Modus bei  $m/z$  137 identifiziert werden. Homovanillinsäure konnte lediglich nach Applikation des Teeaufgusses detektiert werden. Vier der neun Probanden zeigten ein Konzentrationsmaximum bereits 0,5 h nach Aufnahme des Tees. Das durchschnittliche Konzentrationsmaximum aller neun Probanden lag bei  $42,39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (**Abbildung 41**).



**Abbildung 41:** Mittels HPLC-ESI-MS ermittelte Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{mol/L}$ ] von Homovanillinsäure nach Applikation von Holunderblütentee der Probanden 1-9

Homovanillinsäure wird in der Literatur mehrfach als einer der Hauptmetabolite des Quercetins beschrieben, der durch die Mikroflora im menschlichen Darmtrakt gebildet wird (GROSS et al., 1996; OLTHOF et al., 2003). Unter anderem beschrieben OLTHOF et al. (2003), dass nach Applikation von Rutin die Hälfte der verabreichten Dosis als Phenylelessigsäuren gefunden werden konnten. Nachdem der Zucker – in diesem Fall die Rutinose- durch entsprechende Enzyme abgespalten war, kam es durch die Mikroflora des Dickdarms zur Ringspaltung und die gebildeten Phenylelessigsäuren konnten im Dickdarm absorbiert werden. Einschlägige Literaturdaten deuteten weiterhin auf eine Methylierung in der Leber als Hauptmetabolisierungsweg hin. Die Anwesenheit von Homovanillinsäure im Plasma und im Urin der Probanden bestätigt diese These. **Abbildung 42** stellt den postulierten Metabolisierungsweg vom Quercetin-3-rutinosid zur Homovanillinsäure nach OLTHOF et al. (2003) dar.



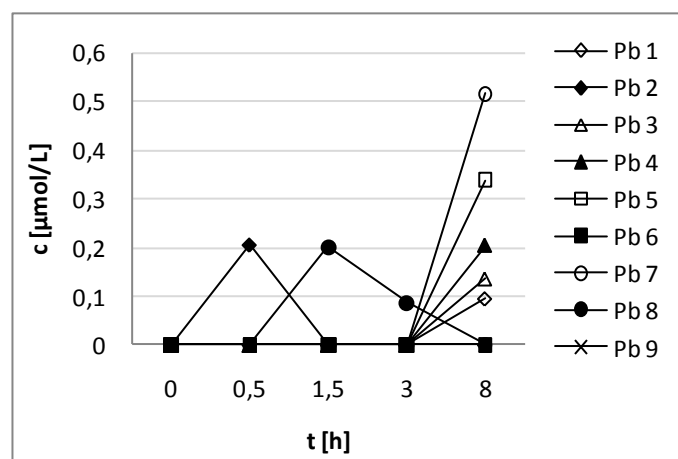
**Abbildung 42:** Postulierter Metabolisierungsweg von Quercetin-3-rutinosid zur Homovanillinsäure nach OLTHOF et al. (2003)

Homovanillinsäure konnte nach Applikation der isolierten antioxidativ wirksamen Fraktion nicht identifiziert werden. Nach Verabreichung der antioxidativen Fraktion konnten allgemein im Plasma sowie im Urin deutlich weniger bis keine Metabolite identifiziert werden. Dieser signifikante Unterschied zu den Ergebnissen der Plasmaanalyse nach der Teeapplikation ist vermutlich anhand der schlechteren Löslichkeit der isolierten Fraktion zu erklären, da die Konzentration beispielsweise an Rutin in beiden Verabreichungsformen nahezu identisch war. Auch in vergangenen Studien wurde der Aspekt der Löslichkeit der verabreichten Substanzen diskutiert. Sowohl Rutin als auch Quercetin besitzen in Wasser eine schlechte Löslichkeit, was sich innerhalb dieser Arbeit bei der Anfertigung des Aufgusses der isolierten Fraktion deutlich bemerkbar machte, da der Aufguss eine deutliche Trübung

aufwies. SCHILCHER UND HAGELS (1996) zeigten, dass Rutin eine 40-fache bessere Löslichkeit innerhalb eines wässrigen Aufgusses eines Buchweizenkrauttees hatte als in Wasser. Dies deutet darauf hin, dass die Komplexität des Teeaufgusses, insbesondere die löslichen Pflanzeninhaltsstoffe, einen großen Einfluss auf den Metabolismus und die Bioverfügbarkeit von Quercetin haben können. Durch eine komplexe Zusammensetzung von löslichen Pflanzeninhaltsstoffen beim Teeaufguss kam es in diesem Zusammenhang ebenfalls zu einer Erhöhung der Löslichkeit des Rutins, was wiederum zu einer verbesserten Absorption führte. Wahrscheinlich ist, dass die Substanzen der isolierten antioxidativen Fraktion aufgrund ihrer signifikant schlechteren Löslichkeit in Wasser nicht oder nur geringfügig absorbiert werden konnten und aus diesem Grund keine bzw. nur eine sehr geringe Bioverfügbarkeit dieser Substanzen festgestellt werden konnte.

### 3.3.3.5 Plasmakonzentrationen von Quercetinsulfat

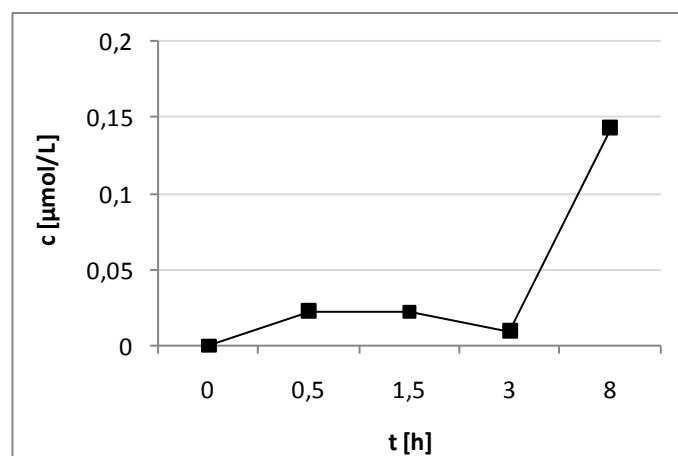
Das Pseudomolekülion  $m/z$  381  $[M-H]^-$  sowie die Fragmentationen  $m/z$  301,  $m/z$  179 und  $m/z$  151 als auch eine Retentionszeit von 51,4 min gaben einen eindeutigen Hinweis auf den Metaboliten Quercetinsulfat. Die Differenz von  $m/z$  80 zwischen Molekülion und Aglykon bestätigte die Abspaltung eines Sulfates. Nach Verabreichung des Tees konnten bei sieben der neun Probanden Konzentrationen zwischen  $0,09 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  und  $0,52 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  nachgewiesen werden. Darunter konnten bei fünf der Probanden Konzentrationsmaxima erst 8 h nach Verabreichung des Tees festgestellt werden. Bei zwei weiteren Probanden hingegen wurden maximale Plasmaspiegel bereits nach 0,5 bzw. 1,5 h festgestellt (**Abbildung 43**). Abermals konnte kein Quercetinsulfat nach Verabreichung der isolierten Fraktion identifiziert werden.



**Abbildung 43:** Mittels HPLC-ESI-MS ermittelte Plasmakonzentrationen  $[\mu\text{mol/L}]$  von Quercetinsulfat nach Applikation von Holunderblütentee der Probanden 1-9

**Abbildung 44** stellt die durchschnittlichen Gehalte des Quercetinsulfates in den Plasmaproben der neun Probanden nach Applikation des Teeaufgusses dar. Der signifikante Konzentrationsanstieg 8 h nach Verabreichung des Tees ist deutlich erkennbar. Innerhalb dieser Studie kann nicht geklärt werden, ob es sich dabei um das Konzentrationsmaximum handelt oder ob die Plasmakonzentration nach 8 h noch weiterhin ansteigt.





**Abbildung 44:** Mittels HPLC-ESI-MS ermittelte durchschnittliche Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{mol/L}$ ] von Quercetinsulfat nach Applikation von Holunderblütentee (n=9)

Besonders die Metabolisierung und Bioverfügbarkeit von Quercetin und seinen Glykosiden wurde bislang in zahlreichen Studien untersucht. Als eines der frühesten Forschungsergebnisse wurde beschrieben, dass Quercetin bzw. seine Glykoside selbst nicht in freier, sondern nur in konjugierter Form im Plasma zu finden sind (DAY et al., 2001; MOON et al., 2000 und MULLEN et al., 2006). Analytische Methoden, die konjugiertes Quercetin nicht erfassen konnten, wurden aus diesem Grund meist nach einer vorangeschalteten enzymatischen oder sauren Hydrolyse durchgeführt. Somit war es möglich, den Plasmaspiegel des Aglykons Quercetin zu bestimmen und seinen zeitlichen Verlauf darzustellen. So konnten einige Autoren nach enzymatischer Behandlung mit Enzymen wie Glukuronidasen und/oder Sulfatasen Quercetin im Plasma nachweisen. In einem Review von MANACH et al. (2005), in dem mehr als 20 Studien miteinander verglichen wurden, wurde der durchschnittliche maximale Quercetinspiegel im Plasma bereits nach 1,1 h erreicht, wobei in weiteren Studien viele kontroverse Aussagen diesbezüglich getroffen wurden. Einige Studien kamen zu dem Ergebnis, dass es nach der Verabreichung von Rutin (als Reinsubstanz) zu einer deutlich längeren Resorptionszeit kommt und maximale Plasmaspiegel des Quercetins durchschnittlich erst nach 6-7 h auftraten. Wie auch in Kapitel 2.4.2 beschrieben, sind Hauptmetabolite die Glucuronid-, Sulfat- und Methylkonjugate des Quercetins. Innerhalb der in dieser Arbeit durchgeführten Humanstudie konnte im Plasma der Probanden ein Quercetinsulfat identifiziert werden. Der durchschnittliche Maximalgehalt im Plasma lag bei  $0,14 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Bei fünf von neun Probanden wurde die Maximalkonzentration des Quercetinsulfates ebenfalls erst nach 8 h festgestellt. Bei zwei weiteren Probanden war ein Maximum nach 0,5 bzw. 1,5 h zu verzeichnen. Insgesamt konnte Quercetinsulfat bei sieben von neun Probanden identifiziert werden. Ein Quercetinglucuronid konnte lediglich im Urin einiger Probanden nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.3.4.2.2). Frei vorliegendes Quercetin konnte innerhalb dieser Arbeit nicht identifiziert werden.

In einer Vergleichsstudie von GRAEFE (2000) wurden Plasmaproben nach Gabe von Rutin als Reinsubstanz sowie als Inhaltsstoff eines Buchweizenkrautextraktes miteinander verglichen. Nach Applikation des Quercetin-3-rutinosids setzte die Resorption signifikant später ein und maximale Plasmaspiegel wurden erst etwa nach 7 h erreicht. Im Gegensatz dazu wurde nach der Applikation des Buchweizenkrautextraktes ein maximaler Plasmaspiegel nach bereits 4 h festgestellt. Auch HOLLMAN et al. (1997) ermittelten einen maximalen Plasmaspiegel erst 9 h nach einer Rutinapplikation. Auch

innerhalb der in dieser Arbeit durchgeführten Humanstudie konnten vergleichbare Daten ermittelt werden, wobei hier nicht eindeutig gesagt werden kann, ob es sich bei dem Plasmaspiegel nach 8 h tatsächlich um die maximale Konzentration handelt, da dies der letzte Zeitpunkt der Blutabnahme war. Die erst nach 8 h auftretenden hohen Plasmaspiegel sind ein Hinweis darauf, dass Quercetin in den verabreichten Aufgüssen zum größten Teil an eine Rutinose gebunden ist (Hauptinhaltsstoff der Holunderblüten ist Quercetin-3-rutinosid) und daher den Resorptions-mechanismen in den obersten Darmabschnitten kaum zugänglich sein kann. Desweiteren wurde von GRAEFE (2000) beschrieben, dass es nach der Applikation eines Buchweizenkrautextraktes im Vergleich zur Applikation des reinen Quercetin-3-rutinosids in identischer Konzentration zu höheren Plasmaspiegeln gekommen ist. Offenbar erhöhen Matrixeffekte innerhalb einer Pflanzenformulierung die Absorption von Rutin, möglicherweise durch die bereits erwähnte Veränderung seiner Löslichkeit. Dies ist vermutlich auch der Grund dafür, dass nach Verabreichung des Teeaufgusses zumindest ein Quercetinsulfat sowie andere Metabolite des Quercetins im Plasma identifiziert werden konnten, während hingegen nach Verabreichung der isolierten Fraktion keine Metabolite des Quercetins detektiert werden konnten.

#### **3.3.3.3.6 Zusammenfassung des Plasmascreenings**

Allgemein war nach Aufnahme des Holunderblütentees und der isolierten Fraktion eine sehr geringe Bioverfügbarkeit der Inhaltsstoffe festzustellen. Aufgrund der hohen interindividuellen Schwankungen sowohl in der qualitativen Zusammensetzung der identifizierten Metabolite als auch in der quantitativen Bestimmung der wenigen nachweisbaren Stoffwechselprodukte war die Interpretation der erhaltenen Daten deutlich erschwert. Dies hat zur Folge, dass die erhaltenen Daten lediglich zur Orientierung dienen können und die Abweichungen zwischen den einzelnen Probanden sehr hoch sind. Nahezu alle Metabolite traten nicht im Plasma aller Probanden auf, sondern waren meist nur bei zwei bis max. sechs der Probanden nachweisbar. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass nur ein sehr geringer Teil der zu erwartenden Metabolite nachgewiesen werden konnte (Tabelle 5). Unveränderte Verbindungen aus den verabreichten Teeaufgüssen sind nicht ins Blut übergegangen und waren nicht bioverfügbar. Vereinzelt konnten Metabolite wie Chinasäure, Ferulasäure und Dihydroferulasäure identifiziert werden. Diese sind mit hoher Wahrscheinlichkeit Stoffwechselprodukte der verabreichten Chlorogensäure, welche in beiden Aufgüssen als Hauptinhaltsstoff enthalten war. Der zweite Hauptinhaltsstoff, das Flavonol-O-glykosid Quercetin-3-rutinosid, konnte im Plasma der Probanden vereinzelt als Quercetinsulfat wiedergefunden werden. Weiterhin konnte das vermutlich aus Quercetin entstandene Ringspaltungsprodukt Homovanillinsäure in beachtlichen Mengen identifiziert werden. Beide Metabolite konnten lediglich in den Plasmaproben von vier der neun Probanden nachgewiesen werden, was abermals die hohe interindividuelle Schwankung deutlich machte. Die folgende zusammenfassende **Tabelle 6** über die Ergebnisse des Plasmascreenings gibt die durchschnittlichen Maximalkonzentrationen der einzelnen Metabolite an. Für die Berechnung der Werte wurden die Plasmakonzentrationen aller neun Probanden herangezogen, also auch die Negativproben bei denen der jeweilige Metabolit nicht nachgewiesen werden konnte.

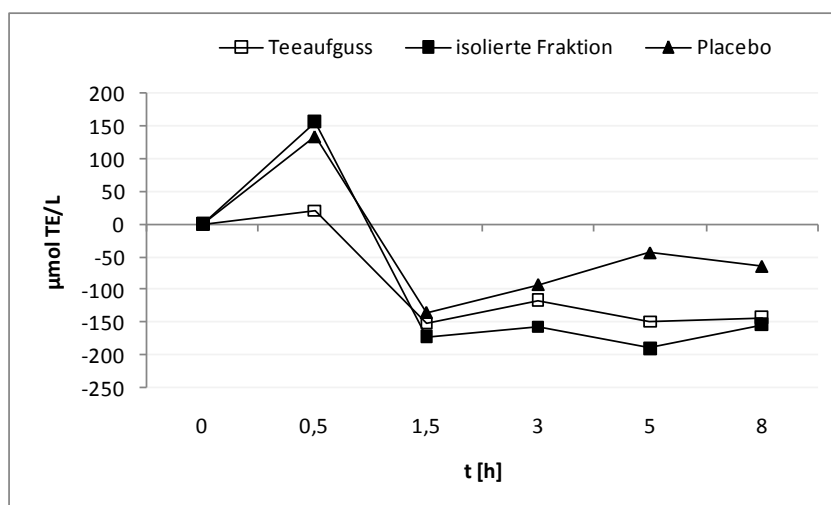
**Tabelle 5:** Charakterisierung der im Plasma enthaltenen Metabolite mit Retentionszeit ( $t_R$ ), Pseudomolekülion ( $[M-H]^+$ ) und Fragmentionen (MS/MS)

Metabolit	$t_R$ [min]	$[M-H]^+$ [m/z]	MS/MS [m/z]
Chinasäure	7,0	191	173, 111
Dihydroferulasäure	23,2	195	179, 134
Ferulasäure	24,9	193	179, 149, 134
Homovanillinsäure	32,1	181	137
Quercetinsulfat	51,4	381	301, 179, 151

**Tabelle 6:** Zusammenfassende Ergebnisse des Plasmascreenings der 9 Probanden

Metabolit	$\emptyset c_{\max}$ Teeaufguss [ $\mu\text{mol}$ ]	$\emptyset c_{\max}$ isolierte Fraktion [ $\mu\text{mol}$ ]	$\emptyset c_{\max}$ Placebo [ $\mu\text{mol}$ ]	$\emptyset t_{\max}$
Chinasäure	15,66	48,91	4,85	8 h
Dihydroferulasäure	0,40	0	0	0,5 h
Ferulasäure	0,09	0	0,03	1,5 h
Homovanillinsäure	42,39	0	0	0,5 h
Quercetinsulfat	0,14	0	0	8 h

Die festgestellten geringen Bioverfügbarkeiten der Inhaltsstoffe aus Holunderblütentee sowie einer isolierten Fraktion daraus stimmen mit den Ergebnissen der Kooperationsstelle der Leibniz Universität Hannover überein. Die dort ermittelten ORAC-Werte der einzelnen Plasmaproben ergaben eine signifikante Abnahme der antioxidativen Aktivität, wie in **Abbildung 45** dargestellt ist. Der Entnahmezeitpunkt 0,5 h nach Verabreichung der jeweiligen Prüfprodukte stellt mit einem Anstieg der antioxidativen Aktivität eine Ausnahme dar.

**Abbildung 45:** Veränderung der antioxidativen Aktivität nach Verabreichung der Aufgüsse sowie des Placebos nach BREITER (2012)

Die deutlichsten Anstiege der antioxidativen Kapazität nach 0,5 h sind nach der Verabreichung der isolierten Fraktion und des Placebos zu verzeichnen, was anhand der innerhalb dieser Arbeit getroffenen qualitativen Aussagen bezüglich der identifizierten Metabolite nicht erklärt werden kann. Vergleicht man weiterhin den geringen Anstieg der antioxidativen Aktivität 0,5 h nach der Verabreichung des Teeaufgusses mit den in dieser Arbeit erhaltenen qualitativen Ergebnissen der identifizierten Metabolite, so fällt auf, dass nach 0,5 h bzw. 1,5 h die Metabolite Ferulasäure und Homovanillinsäure ein Konzentrationsmaximum aufweisen (siehe **Tabelle 6**). Um deren antioxidative Kapazitäten zu ermitteln, wurden ihre antioxidativen Aktivitäten mit Hilfe des TEAC-Tests ermittelt (**Abbildung 56**). Diese lagen deutlich erhöht für Ferulasäure bei 6,4 mmol Trolox/g Einwaage und für Homovanillinsäure bei 4,6 mmol Trolox/g Einwaage und könnten den leichten Anstieg der antioxidativen Aktivität erklären. Hingegen weisen Metabolite, die erst 8 h nach Verabreichung des Teeaufgusses nachgewiesen werden konnten, wie Quercetinsulfat (1,61 mmol Trolox/g Einwaage, DUENAS et al. 2010) oder Chinasäure (0,19 mmol Trolox/g Einwaage) deutlich geringere antioxidative Aktivitäten auf, was eine geringere antioxidative Kapazität des Plasmas erklären könnte. Auch ist es wahrscheinlich, dass die sehr geringen Konzentrationen im Plasma der wenigen identifizierten Metabolite in den durchgeführten ORAC-Tests keine Wirksamkeit zeigen. In einem Vortest dazu wurde erst ab einer Konzentration von 1,6 mg/L eines antioxidativ wirksamen Rooibos-Tees eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität innerhalb des ORAC-Tests gemessen. Die Bioverfügbarkeiten sind demnach deutlich zu gering, um im ORAC-Test anzuschlagen.

In vergleichbaren bisher durchgeführten Interventionsstudien konnte die Bioverfügbarkeit der Metabolite durch eine langfristige kontinuierliche Verabreichung der Prüfprodukte erheblich gesteigert werden. In einer Studie von BOYLE et al. (2000) wurde nach einer täglichen 6-wöchigen Verabreichung von 500 mg Rutin an 18 Probandinnen ein erheblicher Anstieg der Quercetin-, Isorhamnetin- und Kämpferolkonzentration im Plasma festgestellt. Dabei wurden bis zu 10-fach höhere Plasmaspiegel nachgewiesen als zu Beginn der Studie.

### **3.3.4 Humanstudie zur Bioverfügbarkeit von Polyphenolen aus Holunderblüten im Urin**

#### **3.3.4.1 Auswahl der Methode zur Aufarbeitung von Urinproben**

Wie sich nach ersten Tests zeigte, hat die für das Humanplasma entwickelte Flüssig-Flüssig-Extraktion innerhalb der Urinanalytik keine signifikante Aufkonzentrierung der Zielkomponenten erzielen können. Für die Urinmatrix erwies sich eine SPE-Aufarbeitung als überlegen, da durch die Abtrennung von Störsubstanzen eine deutliche Aufreinigung der Probenmatrix erzielt wurde.

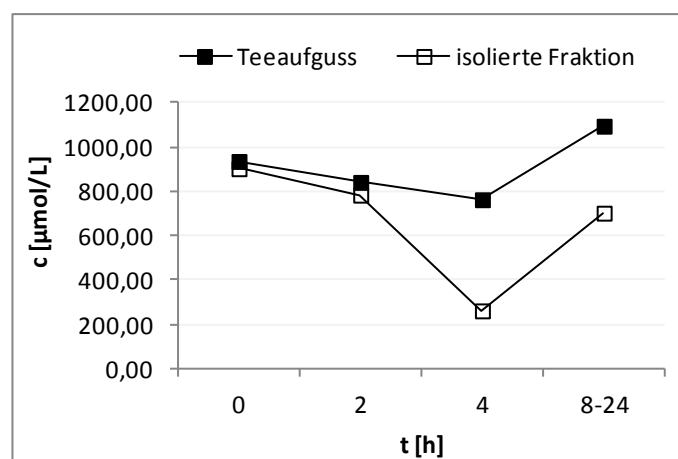
Für einen direkten Vergleich zwischen der sehr zeitaufwendigen SPE-Methode und einem Direktinjizieren einer membranfiltrierten Urinprobe wurden zwei Aliquote einer bestimmten Urinprobe nach beiden Methoden aufgearbeitet und anschließend mittels HPLC-ESI-MS analysiert. Mit Hilfe einer gezielten Suche nach extrahierten Massen („extracted ion chromatogram“) wie beispielsweise der Masse  $m/z$  301 im negativen Modus für das Aglykon Quercetin und einer Vielzahl von verschiedenen spezifischen Massen mehr, konnte sowohl das Auftreten von Metaboliten in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden, als auch die Flächeninhalte der identifizierten

Metabolite miteinander verglichen werden. Wie zu erwarten war, gelang mit der SPE-Methode eine Konzentrierung einiger Metabolite. Dennoch konnte im direkten Vergleich beider Methoden anhand von Stichproben festgestellt werden, dass nach der Aufarbeitung mittels SPE insgesamt weniger Metabolite vorhanden waren. Eine mögliche Ursache könnte ein Verlust der entsprechenden Metabolite durch das Haftenbleiben am SPE-Material bzw. ein Ausspülen innerhalb der Waschphase sein. Auch unter Variierung der Bedingungen der Waschphase und der Elutionsmittel innerhalb der SPE-Aufarbeitung konnte keine Besserung der qualitativen Analyse der Metabolite verzeichnet werden. Hingegen konnte beim wiederholten direkten Injizieren einer authentischen Urinprobe eine Wiederfindungsrate von 98 % erreicht werden. Die mögliche Erfassung aller auftretenden Metabolite, die schnelle und kostengünstige Aufarbeitung allein durch Membranfiltration und die hohe Reproduzierbarkeit waren ausschlaggebend für die Wahl dieser sehr einfachen Methode. Anhand dieser Methode konnten sämtliche Metabolite in den Urinproben qualitativ sowie quantitativ bestimmt werden. Auch Glucuronide und Sulfate konnten mit Hilfe dieser Methode detektiert werden.

### 3.3.4.2 Ergebnisse des Urinscreenings

#### 3.3.4.2.1 Urinkonzentrationen von Hippursäure

Hippursäure wurde anhand seiner Molekülionenmasse von  $m/z$  179, des Fragments  $m/z$  134 sowie der Retentionszeit von 24,1 min identifiziert. Eine zusätzliche Absicherung gab ein Hippursäure-Standard, der zur Identifizierung und später zur Quantifizierung diente. Hippursäure konnte in nahezu allen Urinproben nach Verabreichung des Tees als auch nach Verabreichung der isolierten Fraktion festgestellt werden. Die durchschnittlichen Konzentrationen nach beiden Verabreichungsformen sind in **Abbildung 46** dargestellt.



**Abbildung 46:** Mittels HPLC-ESI-MS ermittelte durchschnittliche Urinkonzentrationen [µmol/L] von Hippursäure nach Applikation von Holunderblütentee sowie einer daraus isolierten antioxidativen Fraktion (n=9)

Wie die hohen Hippursäurekonzentrationen bereits vor der Verabreichung der Teeaufgüsse erahnen lassen, gilt Hippursäure nicht einzig und allein als Metabolit von Polyphenolen, sondern wird ebenfalls endogen im Körper gebildet. Dennoch beschrieben eine Vielzahl vergangener Studien einen Zusammenhang zwischen der Verabreichung von Polyphenolen und der renalen Ausscheidung von Hippursäure. OLTHOF et al. (2003) zeigten, dass 50 % der verabreichten Chlorogensäuren zu Hippursäure metabolisiert und ausgeschieden wurden. Aus einem Vergleich zwischen Probanden mit

und ohne Dickdarmtrakt ging hervor, dass Hippursäure im Dickdarm von Mikroorganismen metabolisiert werden musste.

Auch RECHNER et al. (2001) konnten Hippursäure als unspezifischen Biomarker für die Absorption und den Stoffwechsel von Hydroxyzimtsäuren aus Kaffee ermitteln. Es wird angenommen, dass die Hydroxyzimtsäuren erst in einfachere Phenolsäuren und diese wiederum zu Hippursäure umgewandelt werden. In einer Studie von GONTHIER et al. (2003) wurde anhand eines direkten Vergleichs der Verabreichung von Chlorogensäure, Kaffeesäure und Chinasäure an Ratten festgestellt, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen der verabreichten Chinasäuremenge und der Ausscheidung von Hippursäure gab. Hier wurde postuliert, dass Hippursäure aus Chinasäure gebildet wird. In allen genannten Studien wurde davon ausgegangen, dass die Bildung und Ausscheidung von Hippursäure einen zentralen Metabolisierungsweg von Polyphenolen darstellt.

Die innerhalb dieser Arbeit ermittelten Konzentrationen an Hippursäure zeigten mit der Sammelprobe bei 8-24 h zwar einen leichten Anstieg, welcher allerdings im Vergleich zum Ausgangswert, also der Konzentration vor der Verabreichung des jeweiligen Aufgusses, nicht signifikant genug war. Nach der Verabreichung des Tees war ein Anstieg vom 0-Wert zur Sammelprobe von etwa 15 % zu verzeichnen. Bis 4 h nach der Verabreichung war eine leichte Abnahme der Hippursäurekonzentration zu verzeichnen. Eine deutlich höhere Abnahme der Hippursäurekonzentration im 0-4 h-Intervall war nach Verabreichung der isolierten Fraktion zu verzeichnen. Aber auch hier nahm die Exkretion im 8-24 h-Intervall wieder zu. Nach der Verabreichung des Placebos hingegen konnte kein Anstieg der Hippursäurekonzentration festgestellt werden, was bewies, dass Hippursäure zu einem Teil auch aus den verabreichten Polyphenolen gebildet worden sein musste.

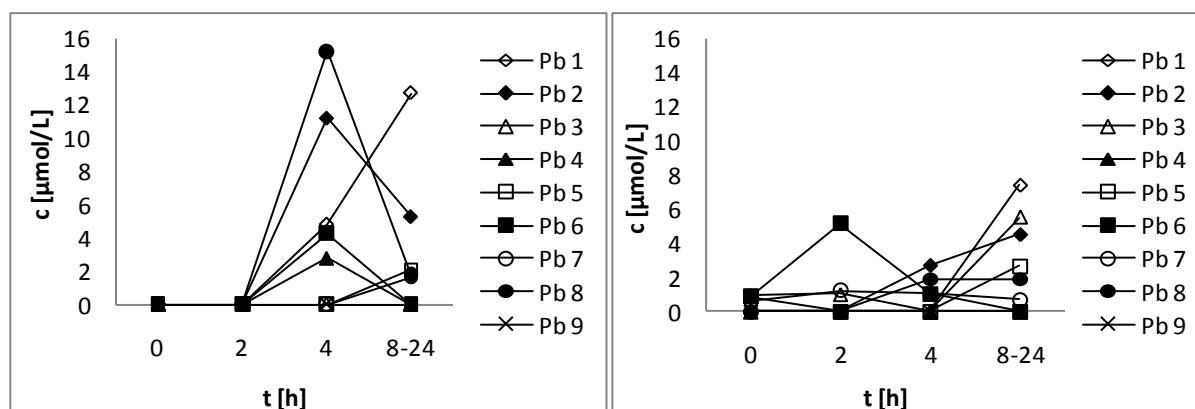
#### **3.3.4.2.2 Urinkonzentrationen von Quercetinglucuronid**

##### **a) Teeaufguss**

Bei sieben von neun Probanden konnte der Metabolit Quercetinglucuronid nach Verabreichung des Teeaufgusses nachgewiesen werden. Die Molekülionenmasse von  $m/z$  478 sowie die Fragmente  $m/z$  302,  $m/z$  180 und  $m/z$  152 als auch eine Retentionszeit von 43,5 min ließen die eindeutige Charakterisierung der Verbindung zu. Bei sechs der neun Probanden war ein Konzentrationsmaximum 4 h nach Verabreichung des Teeaufgusses zu erkennen. Die gemittelte Höchstkonzentration lag bei  $4,26 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

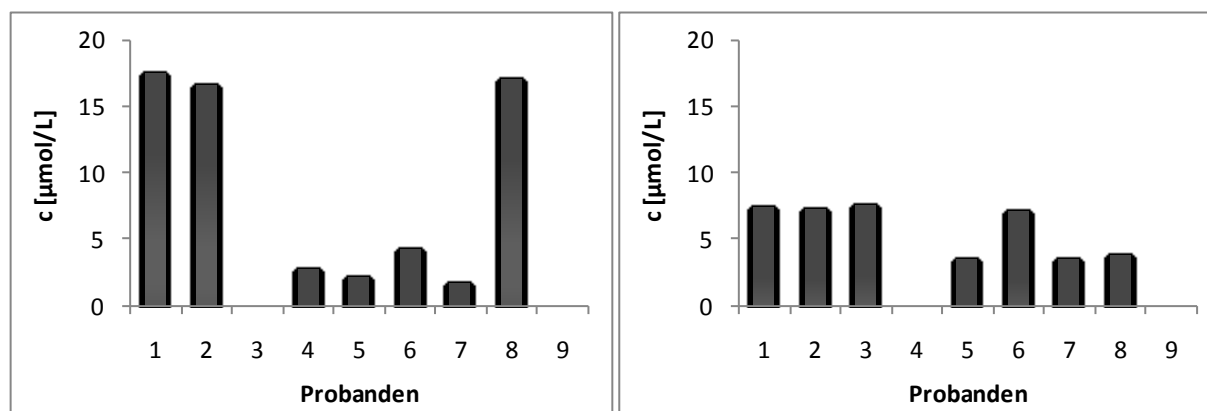
##### **b) Nach Verabreichung der isolierten Fraktion konnte Quercetinglucuronid bei sieben der neun Probanden identifiziert werden. Im Vergleich zur Verabreichung des Teeaufgusses zeigten fast alle Probanden (bis auf 1 Proband) ein Konzentrationsmaximum erst in der Sammelprobe 8-24 h, wobei die Maximalkonzentrationen im Mittel um etwa 40 % geringer ausfielen als bei denen nach Verabreichung des Tees ( $c_{\text{max}} = 2,51 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Ein einzelner Proband schied das Quercetinglucuronid bereits 2 h nach der Verabreichung aus.**

**Abbildung 47** stellt die Konzentrations-Zeit-Diagramme im Vergleich dar.



**Abbildung 47:** Mittels HPLC-ESI-MS ermittelte Urinkonzentrationen [ $\mu\text{mol/L}$ ] von Quercetinglucuronid nach Applikation von Holunderblütentee (links) und isolierter Fraktion (rechts) der Probanden 1-9

Die ausgeschiedene Menge an Quercetinglucuronid nach Verabreichung der isolierten Fraktion ist im Vergleich zur Menge nach Verabreichung des Tees wesentlich geringer. Zwar enthielten beide Aufgüsse eine vergleichbar hohe Konzentration an Rutin, der Teeaufguss enthielt aber außerdem noch ein weiteres Quercetinglykosid, das ebenso zur Ausscheidung des Quercetinglucuronids beitragen und die höhere Konzentration erklären könnte. Das frühe Konzentrationsmaximum nach 4 h ist ein Indiz dafür, dass Quercetinverbindungen aus dem Teeaufguss, der komplexeren Matrix, schneller metabolisiert werden. Eine weitere Veranschaulichung gibt **Abbildung 48**, in der die Gesamtgehalte für die einzelnen Probanden über einen Zeitraum von 24 h dargestellt sind.



**Abbildung 48:** Mittels HPLC-ESI-MS ermittelte Gesamturinkonzentrationen [ $\mu\text{mol/L}$ ] in 24 h von Quercetinglucuronid nach Applikation von Holunderblütentee (links) und isolierter Fraktion (rechts) der Probanden 1-9

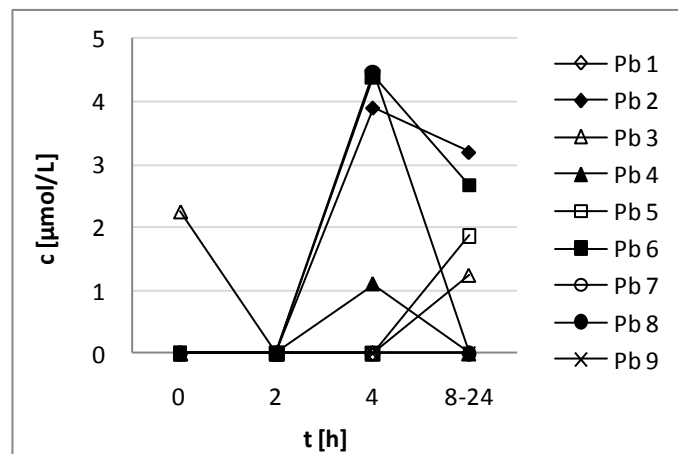
Neben der deutlich geringeren renalen Ausscheidung nach Verabreichung der isolierten Fraktion ist auch in **Abbildung 48** die interindividuelle Schwankung deutlich zu erkennen.

Während verschiedene Autoren Quercetinglucuronid oder auch mehrere Quercetinglucuronide meist systemisch verfügbar als Metabolit/e im Plasma feststellen konnten (u.a. MULLEN et al., 2004; DAY et al., 2001; GRAEFE et al., 2001), konnte dies innerhalb der in dieser Arbeit durchgeführten Studie nicht bestätigt werden, da ein Quercetinglucuronid lediglich im Urin nachgewiesen werden konnte. Aber auch die Anwesenheit des Metaboliten im Urin deutet auf eine Spaltung des Aglykons sowie eine Konjugation mit einem Glucuronid. Die Glucuronidierung von phenolischen Substanzen wird im Allgemeinen durch Enzyme der Familie UGT1A katalysiert, die hauptsächlich im Darm, in der Leber und in den Nieren vorkommen (OLIVEIRA et al., 2002). In der Dünndarmmukosa wurden bislang höchste Aktivitäten dafür gefunden (SPENCER et al., 1999). Verschiedene Umwelteinflüsse sowie genetische

Faktoren können die individuellen Aktivitäten der UGT Enzyme beeinflussen (SCALBERT und WILLIAMSON, 2000). Eine Konjugation mit verschiedenen Stoffwechselprodukten (Glucuronidierung, Sulfatierung, Methylierung) gilt allgemein als sehr wahrscheinlich. In zahlreichen Studien wurden vorrangig Konjugate identifiziert und keine frei vorliegenden oder unveränderten Verbindungen (PAGANGA und RICE-EVANS, 1997). Als logischer Zusammenhang versteht sich, dass die systemische Verfügbarkeit stark von der verabreichten Konzentration bzw. Dauer abhängt. Unter anderem konnten BOYLE et al. (2000) erst nach einer sechswöchigen täglichen Verabreichung von Rutin einen signifikanten Anstieg des Plasmaspiegels feststellen. Die verabreichte Dosis des Rutins lag bei 500 mg pro Tag, was die in dieser Studie verabreichte Menge um mehr als das Doppelte überstieg. Die geringe systemische Verfügbarkeit der Quercetinverbindungen innerhalb der hier durchgeführten Humanstudie ist vermutlich auf die geringe verabreichte Dosis zurückzuführen, die zudem nur als Einzelapplikation gegeben wurde. Nach einer Gabe über mehrere Tage oder Wochen sind deutlich erhöhte Plasmaspiegel nachgewiesen worden (CONQUER et al., 1998; MOON et al., 2000; BOYLE et al., 2000).

#### 3.3.4.2.3 Urinkonzentrationen von Kämpferolglucuronid

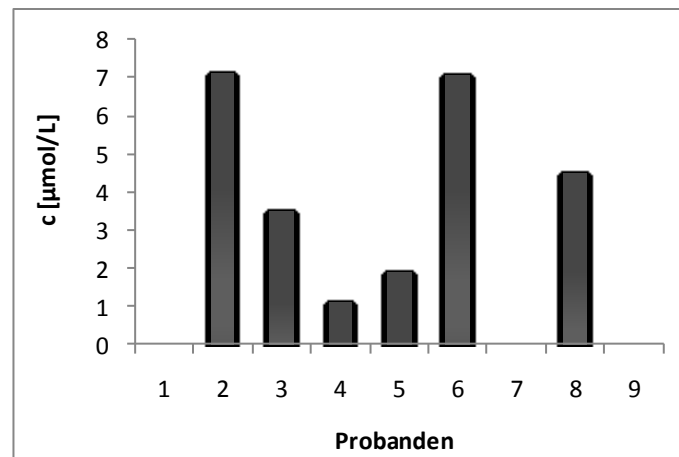
Das Fragment mit der Masse  $m/z$  285  $[M-H]^-$  und die  $MS^2$ -Fragmente  $m/z$  258 und  $m/z$  230 gaben den Hinweis auf das Aglykon Kämpferol. Anhand der Molekülionenmasse von  $m/z$  462 und der daraus errechneten Differenz zum Aglykon von  $m/z$  176 konnte ein Kämpferolglucuronid zugeordnet werden. Diese Verbindung konnte lediglich nach Verabreichung des Teeaufgusses detektiert werden und trat im Urin von sechs der neun Probanden auf. Das durchschnittliche Konzentrationsmaximum trat 4 h nach Verabreichung des Tees auf, wie auch **Abbildung 49** zeigt.



**Abbildung 49:** Mittels HPLC-ESI-MS ermittelte Urinkonzentrationen  $[\mu\text{mol/L}]$  von Kämpferolglucuronid nach Applikation von Holunderblütentee der Probanden 1-9

Ähnlich wie beim Quercetin konnte hier davon ausgegangen werden, dass die im Tee enthaltenen Kämpferolglykoside zu Beginn der Metabolisierung gespalten wurden, sodass das Aglykon Kämpferol absorbiert und in diesem Fall mit Glucuronsäure konjugiert wurde, was eine der häufigsten Konjugationen darstellt. Aus **Abbildung 50** werden auch hier wieder die hohen interindividuellen Schwankungen deutlich.

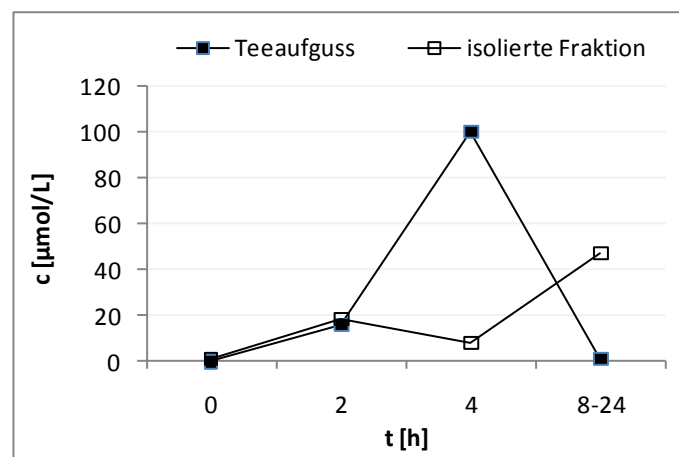




**Abbildung 50:** Mittels HPLC-ESI-MS ermittelte Gesamturinkonzentrationen [µmol/L] in 24 h von Kämpferolglucuronid nach Applikation von Holunderblütentee

#### 3.3.4.2.4 Urinkonzentrationen von Homovanillinsäure

In vergleichsweise hoher Konzentration konnte Homovanillinsäure im Urin sowohl nach Verabreichung des Tees als auch nach Gabe der isolierten Fraktion nachgewiesen werden. Die Charakterisierung des Metabolits war durch die Molekülionienmasse  $m/z$  182, das Fragment  $m/z$  137 und der Retentionszeit von 32,1 min möglich. Die gemittelten Werte der **Abbildung 51** setzen sich aus den Werten von nur jeweils 3 Probanden zusammen, da nur bei diesen eine renale Ausscheidung der freien Homovanillinsäure nachzuweisen war. Die durchschnittlichen Konzentrationen zeigen, dass deutlich höhere renale Ausscheidungskonzentrationen nach Verabreichung des Tees gemessen werden konnten, während die ermittelten Konzentrationen nach Gabe der isolierten Fraktion erheblich geringer waren.



**Abbildung 51:** Mittels HPLC-ESI-MS ermittelte durchschnittliche Urinkonzentrationen [µmol/L] von Homovanillinsäure nach Applikation von Holunderblütentee sowie einer daraus isolierten antioxidativen Fraktion (n=9)

Wie bereits in Abschnitt 3.3.3.4 beschrieben, stellt Homovanillinsäure einen der intestinalen Hauptmetabolite des Quercetins dar. In einer vergleichenden Humanstudie von OLTHOF et al. (2003) wurden Probanden mit und ohne intaktem Darmtrakt für die Bioverfügbarkeitsuntersuchungen herangezogen. Nach Verabreichung von Rutin an die Probanden mit intaktem Darmtrakt wurde Rutin selbst im Dünndarm nicht bzw. nur sehr geringfügig absorbiert, zum Dickdarm weitertransportiert, wo es zur Metabolisierung kam. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Rutin zu Beginn zum Aglykon

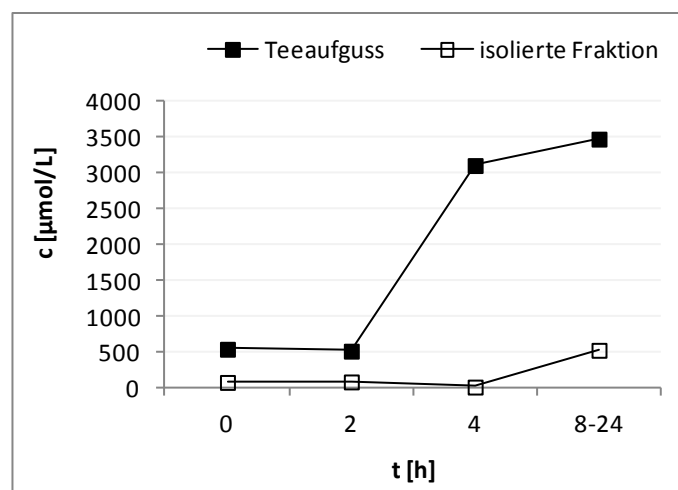
deglykosyliert wurde und die Ringspaltung des Quercetins zu den Phenyllessigsäuren dann von der Mikroflora des Dickdarms initiiert wurde. Die gebildeten Phenyllessigsäuren wurden anschließend im Dickdarm absorbiert und dann in Leber und Niere weitermetabolisiert. Etwa die Hälfte des verabreichten Rutins wurde als Phenyllessigsäure im Urin wiedergefunden. Bei der Verabreichung an Probanden ohne intakten Darmtrakt konnten hingegen keine Metabolite des Rutins nachgewiesen werden.

Die Methylierung gilt als eine wichtige Metabolisierungsreaktion, die meist in der Leber stattfindet, wie die Gegenwart von Homovanillinsäure im Plasma bereits vermuten ließ (siehe **Abbildung 42**). Nach Verabreichung des Teeaufgusses konnte nach 4 h eine durchschnittliche Urinkonzentration von 100  $\mu\text{mol/L}$  ermittelt werden. Die deutlich niedrigere Konzentration nach Verabreichung der isolierten Fraktion lässt sich vermutlich auch hier wiederum zu einem Teil durch die schlechte Löslichkeit der Fraktion erklären, kann aber zum anderen Teil auch durch den deutlich niedrigeren Gehalt an Quercetin in der Fraktion hervorgerufen worden sein. Denn während der Teeaufguss mindestens 2 verschiedene Quercetinglykoside enthält, ist die Zusammensetzung der verabreichten Fraktion deutlich weniger komplex, was in diesem Fall ebenfalls einen Einfluss auf die niedrige Wiederfindung von Metaboliten haben kann.

Auch in einer Interventionsstudie von GRAEFE (2000) wurde eine höhere renale Ausscheidungsrate des Quercetinkonjugats Homovanillinsäure nach Applikation von Rutin in Form von Buchweizenkraut ( $\emptyset$  128  $\mu\text{mol/Tag}$ ) als in Form seiner Reinsubstanz ( $\emptyset$  105  $\mu\text{mol/Tag}$ ) festgestellt. GRAEFE (2000) beschreibt ebenfalls, dass Co-Faktoren in der Pflanzenmatrix die Absorption von Rutin, möglicherweise durch Veränderung seiner Löslichkeit oder Stimulation von Resorptionsmechanismen, erhöhen. Mit den durchschnittlichen Ausscheidungsraten von 116  $\mu\text{mol/Tag}$  nach Teegabe und 75  $\mu\text{mol/Tag}$  nach Verabreichung der isolierten Fraktion ergibt sich eine recht gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen von GRAEFE (2000).

#### **3.3.4.2.5 Urinkonzentrationen von Homovanillinsäuresulfat**

Neben der freien Homovanillinsäure konnte weiterhin ein Sulfat der Homovanillinsäure nach Verabreichung beider Aufgüsse identifiziert werden. Die Differenz der Molekülionienmasse ( $m/z$  262) zum Hauptfragment der Homovanillinsäure  $m/z$  182 betrug  $m/z$  80, sodass von einem Sulfat ausgegangen werden konnte. Nach Verabreichung des Teeaufgusses konnte dieses in den Urinproben von sieben Probanden nachgewiesen werden. Nach Verabreichung der weniger komplexen isolierten Fraktion war das Sulfat nur bei vier der insgesamt neun Probanden nachzuweisen. Verglichen mit den gemittelten Konzentrationen aller 9 Probanden ergeben sich sehr unterschiedliche Konzentrations-Zeit-Diagramme, wie **Abbildung 52** zeigt.

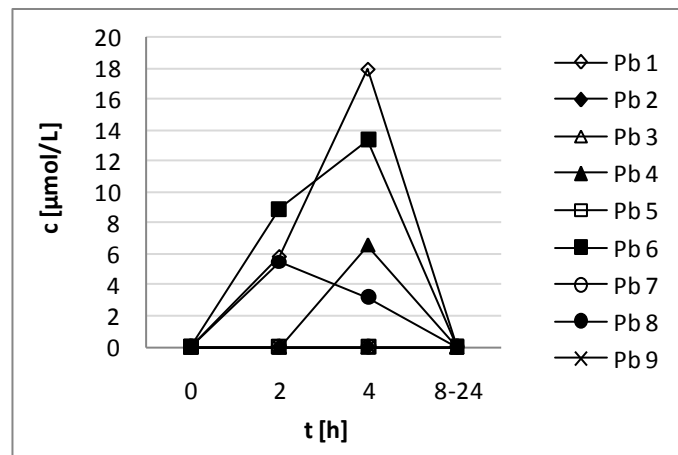


**Abbildung 52:** Mittels HPLC-ESI-MS ermittelte durchschnittliche Urinkonzentrationen [ $\mu\text{mol/L}$ ] von Homovanillinsäuresulfat nach Applikation von Holunderblütentee sowie einer daraus isolierten antioxidativen Fraktion ( $n=9$ )

Die im Vergleich zu den anderen identifizierten Metaboliten sehr hohe renale Ausscheidungsrate des Homovanillinsäuresulfates nach Verabreichung des Tees kommt nicht nur allein durch die flavonoidreiche Ernährung der Probanden zu Stande. Auch nach Verabreichung des Placebos konnte ein mittlerer Homovanillinsäuresulfatgehalt von  $484 \mu\text{mol/L}$  bestimmt werden, was für eine gleichzeitige endogene Bildung im Körper spricht, die nicht von der Verabreichung des Quercetins herrührt. Auch BABA et al. (1981) konnten Homovanillinsäure anhand von Isotopenmarkierungen als endogen gebildete Substanz identifizieren. Nach der Aufnahme des Teeaufgusses war innerhalb dieser Studie dennoch ein signifikanter Anstieg der renalen Ausscheidung des Homovanillinsäuresulfates zu erkennen, wobei die maximalen Konzentrationen in der Sammelprobe nach 8-24 h ( $\bar{c}_{\text{max}} = 3476 \mu\text{mol/L}$ ) identifiziert werden konnten. Im Gegensatz dazu erreichten die maximalen Konzentrationen nach Verabreichung der isolierten Fraktion nach 8-24 h nur  $528 \mu\text{mol/L}$ , was ebenfalls durch die geringere verabreichte Gesamtquercetinkonzentration zu erklären ist. Aus vergangenen Studien geht bislang keine Identifizierung eines Homovanillinsäuresulfates aus dem Urin hervor. Grund dafür ist die enzymatische Aufarbeitung der Proben mittels Glukuronidasen und Sulfatasen, die im Anschluss an die Probenaufarbeitung keine Qualifizierung der Verbindungen mehr zulässt, sondern lediglich freie Homovanillinsäure erfasst. Homovanillinsäure selbst konnte bereits mehrfach als Metabolit des Quercetins identifiziert werden (OLTHOF et al., 2003; GRAEFE, 2000 u.a.).

#### 3.3.4.2.6 Urinkonzentrationen von 5-Kaffeoylchinasäure

Die im Teeaufguss sowie in der isolierten Fraktion vorkommende Chlorogensäure (5-Kaffeoylchinasäure) konnte nach Verabreichung des Teeaufgusses bei vier der neun Probanden im Urin unverändert wiedergefunden werden (**Abbildung 53**). Die renale Ausscheidung betrug nach 24 Stunden durchschnittlich  $6,81 \mu\text{mol}$ , was einer Wiederfindung von 1,28 % der im Tee vorliegenden Menge ( $531 \mu\text{mol/L}$ ) entsprach. Nach Verabreichung der isolierten Fraktion war keine 5-Kaffeoylchinasäure nachweisbar. Das gemittelte Konzentrationsmaximum aller Probanden lag bei  $4,57 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  und konnte durchschnittlich 4 h nach Verabreichung festgestellt werden.

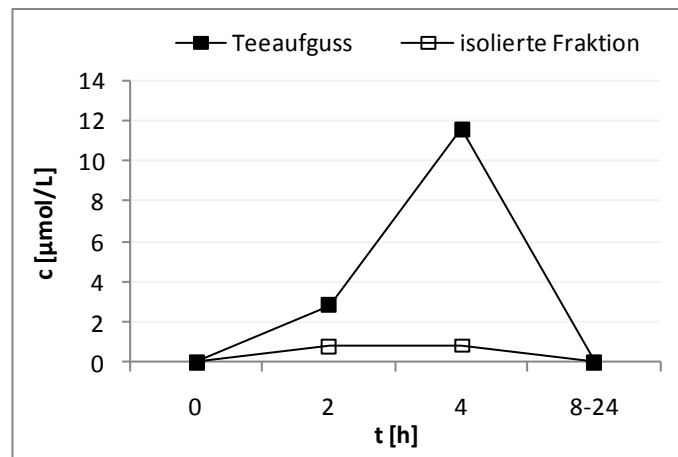


**Abbildung 53:** Mittels HPLC-ESI-MS ermittelte Urinkonzentrationen [ $\mu\text{mol/L}$ ] von 5-Kaffeoylchinasäure nach Applikation von Holunderblütentee der Probanden 1-9

Bereits innerhalb verschiedener Humanstudien konnte 5-Kaffeoylchinasäure im Urin nach Gabe von z.B. Kaffee (ITO et al., 2005) oder Apfelsaft (KAHLE, 2008) identifiziert werden, wobei 5-Kaffeoylchinasäure jeweils die Hauptkomponente darstellte. Auch im hier untersuchten Teeaufguss aus Holunderblüten war 5-Kaffeoylchinasäure mit einer Konzentration von 188 mg/L einer der Hauptinhaltsstoffe (siehe Kapitel 3.2.2). Wegen seines hohen Gehaltes im Teeaufguss sowie aufgrund der nach bereits 2 h stark ansteigenden renalen Ausscheidung von 5-Kaffeoylchinasäure war anzunehmen, dass es sich hierbei nicht um einen Metaboliten handelt, sondern um die unveränderte Substanz aus dem Teeaufguss. Auch hier war nach Verabreichung der isolierten Fraktion 5-Kaffeoylchinasäure nicht nachweisbar, wobei der Gehalt in der Fraktion mit 52 mg/L zwar deutlich niedriger war, aber auch die Löslichkeit der Fraktion im Aufguss eine erhebliche Rolle spielen kann, wie bereits unter 3.3.3.3.4 diskutiert wurde.

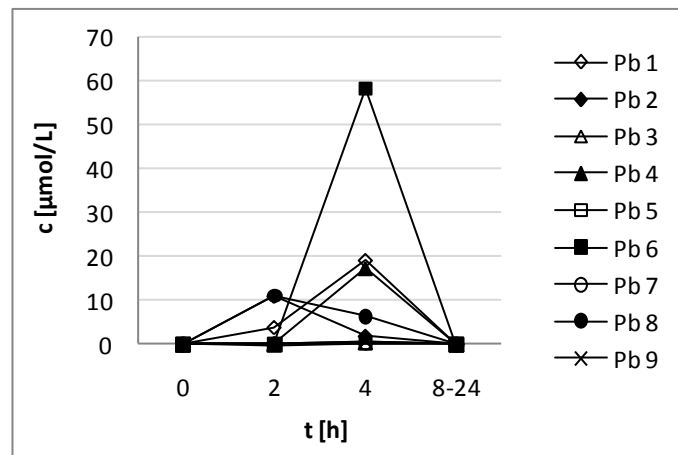
#### 3.3.4.2.7 Urinkonzentrationen von 5-Feruloylchinasäure

Anhand der ESI-MS-Daten und des Vergleichs der Daten aus CLIFFORD et al. (2003) konnte die bei 23,3 min eluierende Verbindung als 5-Feruloylchinasäure identifiziert werden. Diese konnte sowohl nach Verabreichung des Teeaufgusses als auch nach Verabreichung der isolierten Fraktion identifiziert werden, wie **Abbildung 54** zeigt. Das Konzentrationsmaximum nach der Verabreichung der isolierten Fraktion unterschreitet die maximale Konzentration nach Verabreichung des Teeaufgusses ( $11,58 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) um ein Vielfaches und liegt nur bei etwa  $0,83 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Das Konzentrationsmaximum nach Verabreichung des Tees konnte 4 h nach Verabreichung detektiert werden, wie in **Abbildung 54** zu sehen ist.



**Abbildung 54:** Mittels HPLC-ESI-MS ermittelte durchschnittliche Urinkonzentrationen [ $\mu\text{mol/L}$ ] von 5-Feruloylchinasäure nach Applikation von Holunderblütentee sowie einer daraus isolierten antioxidativen Fraktion ( $n=9$ )

Wie in **Abbildung 55** nur bedingt zu erkennen ist, konnte 5-Feruloylchinasäure in den Urinproben aller Probanden nach Verzehr des Teeaufgusses nachgewiesen werden. Nach Gabe der isolierten Fraktion konnte lediglich bei vier der neun Probanden 5-Feruloylchinasäure im Urin nachgewiesen werden.



**Abbildung 55:** Mittels HPLC-ESI-MS ermittelte Urinkonzentrationen [ $\mu\text{mol/L}$ ] von 5-Feruloylchinasäure nach Applikation von Holunderblütentee der Probanden 1-9

Feruloylchinasäure ist im Teeaufguss sowie auch in der isolierten Fraktion in einer Konzentration von jeweils etwa 7 mg/L enthalten.

Wie aus verschiedenen Literaturstellen hervorgeht, ist bereits mehrfach in Studien nachgewiesen worden, dass Ferulasäure als Stoffwechselprodukt durch Methylierung aus Kaffeesäure oder ähnlichen Verbindungen gebildet wird. In den Veröffentlichungen von MONTEIRO et al. (2007) und DEL RIO et al. (2010) konnte Feruloylchinasäure im Urin jeweils eines einzelnen Probanden nachgewiesen werden. Hingegen konnte Kaffeoylchinasäure, die zu einem vergleichbar hohen Gehalt im verabreichten Kaffee enthalten war, mit einer deutlich höheren Ausscheidungskonzentration im Urin aller Probanden nachgewiesen werden. Die Annahme, dass die hier nachgewiesene Feruloylchinasäure unverändert aus den verabreichten Aufgüssen stammt, kann somit weitestgehend vernachlässigt werden, wofür ebenfalls die sehr geringe Konzentration in den verabreichten Aufgüssen spricht. Eine andere Erklärung für das Auftreten der Feruloylchinasäure im Urin der Probanden könnte anhand des hohen Gehaltes an 5-Kaffeoylchinasäure in den Getränken erklärt werden. Wie bereits beschrieben, spielt die Methylierung innerhalb des Metabolismus eine wichtige Rolle. Auch wurde in zahlreichen

Veröffentlichungen die Methylierung von beispielsweise Kaffeesäure zur Ferulasäure beschrieben (RECHNER et al., 2001). Eine weitere Möglichkeit der Entstehung der 5-Feruloylchinasäure ist die Methylierung der zu einem sehr hohen Anteil vorkommenden 5-Kaffeoylchinasäure und gilt hier am wahrscheinlichsten.

#### 3.3.4.2.8 Urinkonzentrationen von Ferulasäuresulfat

In den Urinproben zweier Probanden konnte weiterhin ein Ferulasäuresulfat anhand seiner spezifischen Massendaten identifiziert werden ( $m/z$  273  $[M-H]^-$ ,  $m/z$  194,  $m/z$  134). Der Metabolit war nur nach Verabreichung des Teeaufgusses nachweisbar und wies ein durchschnittliches Konzentrationsmaximum von  $1,07 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  4 h nach Verabreichung auf.

Das Vorkommen von Ferulasäuresulfat als Metabolit ist bereits bekannt. STALMACH et al. (2009) konnten nach der Verabreichung von Kaffee Ferulasäuresulfat im Plasma und auch im Urin identifizieren.

#### 3.3.4.2.9 Zusammenfassung des Urinscreenings

Auch beim Urinscreening erschwerten die interindividuellen Schwankungen zwischen den einzelnen Probanden die Interpretation der Ergebnisse erheblich. Während Hippursäure und Homovanillinsäure sowie dessen Sulfat im Körper auch endogen gebildet werden, sind andere identifizierte Substanzen wie 5-Kaffeoylchinasäure unveränderte Verbindungen aus dem verabreichten Getränk und Verbindungen wie Quercetinglucuronid Metabolite, die im Körper gebildet wurden. **Tabelle 7** zeigt alle identifizierten Verbindungen im Urin mit ihren jeweiligen Retentionszeiten sowie Pseudomolekülionenmassen und Fragmenten. **Tabelle 8** gibt deren durchschnittliche Höchstkonzentrationen im Urin der Probanden nach Verabreichung der jeweiligen Prüfprodukte an. Eine genaue Auflistung befindet sich in Anhang 7.4.

**Tabelle 7:** Charakterisierung der im Urin enthaltenen Metabolite mit Retentionszeit ( $t_R$ ), Pseudomolekülion ( $[M-H]^-$ ) und Fragmentationen

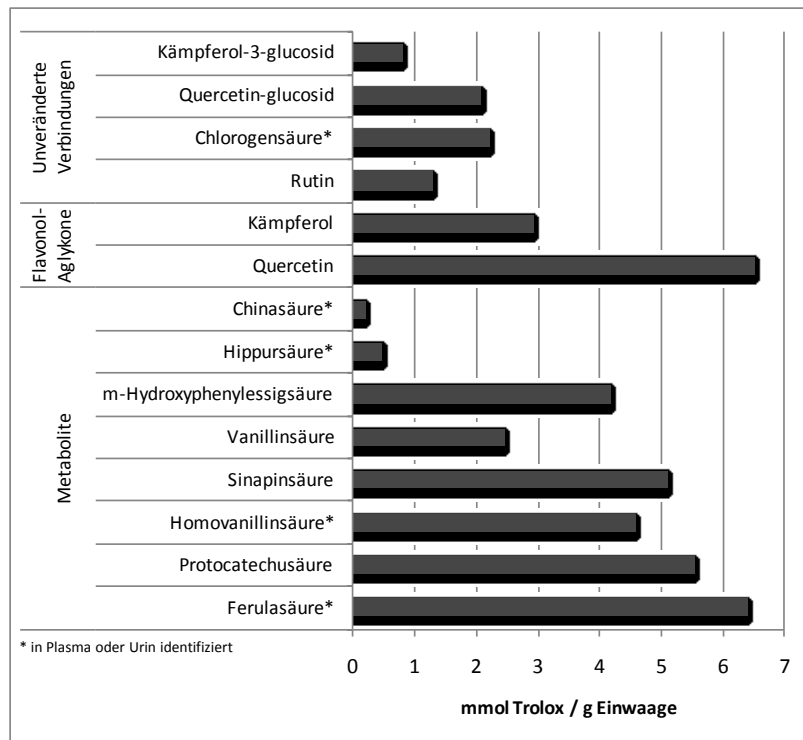
Metabolit	$t_R$ [min]	$[M-H]^-$ [m/z]	MS/MS [m/z]
5-Feruloylchinasäure	23,3	367	<u>191</u> , 173
Hippursäure	24,1	178	<u>134</u>
Homovanillinsäure	32,1	181	<u>137</u>
Homovanillinsäuresulfat	22,4	261	<u>181</u> , <u>137</u>
5-Kaffeoylchinasäure	21,0	353	<u>191</u> , 179
Kämpferolglucuronid	59,0	461	<u>285</u> , 257
Quercetinglucuronid	43,5	477	<u>301</u> , 179, 151

**Tabelle 8:** Zusammenfassende Ergebnisse des Urinscreenings der 9 Probanden

Metabolit	$\emptyset$ $c_{\max}$ Teeaufguss [ $\mu\text{mol}$ ]	$\emptyset$ $c_{\max}$ isolierte Fraktion [ $\mu\text{mol}$ ]	$\emptyset$ $c_{\max}$ Blindwert [ $\mu\text{mol}$ ]
5-Feruloylchinasäure	11,58	0,83	0
Hippursäure	1095,79	903,77	926,56
Homovanillinsäure	100,22	47,16	0,99
Homovanillinsäuresulfat	3476,88	527,84	483,79
5-Kaffeoylchinasäure	4,56	0	0
Kämpferolglucuronid	1,54	0	0,25
Quercetinglucuronid	4,26	2,51	0

### 3.3.5 Antioxidative Aktivitäten ausgewählter Metabolite im TEAC-Assay

Für eine Abschätzung des antioxidativen Potentials der identifizierten Metabolite bzw. unveränderten Verbindungen nach der Holunderblütenteeaufnahme wurden einige Referenzsubstanzen sowie isolierte Verbindungen mittels TEAC getestet. Nachteil des TEAC-Assays ist, dass das verwendete  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -Radikalkation im menschlichen Organismus nicht vorkommt und infolgedessen nicht als Parameter für die antioxidative Wirkung im Körper des Menschen angesehen werden kann. Dennoch können die erhaltenen Werte, die ein Maß für die radikalfangende Eigenschaft einer Substanz widerspiegeln, als Anhaltspunkte für die antioxidative Wirksamkeit der einzelnen Verbindungen betrachtet werden. **Abbildung 56** gibt einen Überblick über die antioxidativen Wirksamkeiten ausgewählter unveränderter Verbindungen, die der verabreichte Teeaufguss enthielt, gespaltener Flavonol-Aglykone und ausgewählter möglicher Metabolite, die unverändert ins Blutplasma übergehen bzw. innerhalb des Metabolismus im menschlichen Körper aus den Inhaltsstoffen des Tees gebildet werden können.



**Abbildung 56:** Antioxidative Aktivitäten möglicher unveränderter Verbindungen und Metabolite im Plasma und Urin [mmol Trolox / g Einwaage]

Die im Plasma identifizierten Verbindungen wie Ferulasäure und Homovanillinsäure zeigten im TEAC-Test hohe antioxidative Aktivitäten. Im Gegensatz zur Ferulasäure war Homovanillinsäure in einer deutlich höheren Konzentration im Plasma zu finden ( $c_{\text{max}} = 42,39 \mu\text{mol}$ ), wobei es sich im Verhältnis zur verabreichten Quercetinmenge dennoch um eine so geringe Konzentration handelte, dass diese zu keiner Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Plasmas führte, wie die Ergebnisse des ORAC-Tests aus 3.3.3.3.6 belegen. Auch ein Quercetinsulfat lag in einer solch geringen Konzentration im Plasma vor, dass es zwar identifiziert werden konnte, aber keinen Einfluß auf die antioxidative Aktivität des Plasmas nahm. Nach einem Review von MANACH et al. (2005) konnten in der Mehrzahl der bislang durchgeführten Studien, nach Applikation verschiedener Quercetinderivate oder Pflanzenextrakte, Quercetinmetabolite wie Quercetinglucuronid, Quercetinsulfat oder das methylierte Quercetin Isorhamnetin im Plasma festgestellt werden, jedoch kein freies Quercetin. Während freies Quercetin innerhalb des TEAC-Tests ein sehr hohes antioxidatives Potential aufwies, sind die antioxidativen Kapazitäten der Quercetin-Aglykone Quercetin-glucosid und Quercetin-rutinosid deutlich geringer. Die im Urin identifizierten Metabolite wiesen zwar deutlich höhere Konzentrationen auf als die des Plasmas, deren Einfluß auf die antioxidative Wirksamkeit des Urins war jedoch schwer abzuschätzen, da der Urin nicht auf seine antioxidative Wirksamkeit getestet wurde.

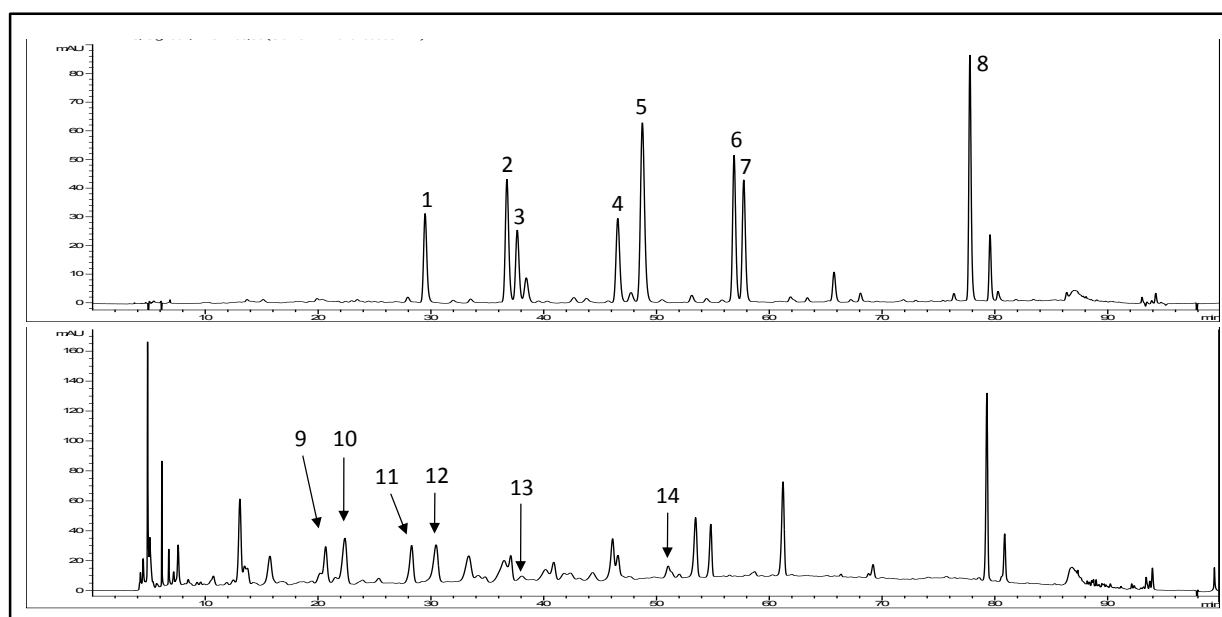


### 3.4 Silberlindenblüten

#### 3.4.1 Polyphenolprofil

In der Literatur existieren bislang nur wenig Angaben zu den Inhaltsstoffen von Silberlindenblüten. TOKER et al. (2001) beschrieben die Flavonoide Quercetin-3,7-dirhamnosid, Quercetin-3-glucosid (Isoquercitrin), Quercetin-3-rutinosid (Rutin), Quercetin-3-rhamnosid (Quercitrin), Kämpferol-3-glucosid (Astragalin) und Kämpferol-3-(6-p-cumaroylglucosid) (Tilirosid). Kämpferol-3-rhamnosid (Afzelin) und Kämpferol-3,7-dirhamnosid wurden als weitere Flavonoide von MATSUDA et al. (2002) beschrieben. ZUB (1970) und CHARI et al. (1978) konnten außerdem folgende Flavonolglykoside mittels Dünnschichtchromatographie identifizieren: Quercetin-3-glucosid-7-rhamnosid, Quercetin-rhamnoxylosid und Kämpferol-3-glucosid-7-rhamnosid. Procyanidine aus Silberlindenblüten wurden in der Literatur bislang nicht beschrieben, lediglich in den artverwandten Lindenblüten konnten die dimeren Procyanidine B2 und B4 nachgewiesen werden (LANGHAMMER et al., 1981).

**Abbildung 57** zeigt das HPLC-DAD-Chromatogramm eines methanolischen Silberlindenblütenextraktes bei 354 und 280 nm.



**Abbildung 57:** HPLC-Chromatogramm eines methanolischen Silberlindenblütenextraktes bei 354 nm (oben) und 280 nm (unten), (Peakzuordnung siehe **Tabelle 9** und **Tabelle 10**)

Das obere Chromatogramm zeigt die Trennung eines Extraktes bei 354 nm. Der Großteil der Flavonolglykoside konnte mittels LC-ESI-MS identifiziert werden. Die erhaltenen MS-Daten gaben erste Hinweise auf das Vorhandensein von Minorkomponenten und bislang noch unbekannten Verbindungen. Einige der Minorkomponenten konnten im Laufe dieser Arbeit isoliert und strukturell aufgeklärt werden.

Die Tabellen 9 und 10 zeigen die Hauptinhaltsstoffe und deren Gehalte in einem methanolischen Extrakt.

Das untere Chromatogramm zeigt die Trennung des Silberlindenblütenextraktes bei 280 nm. Mittels LC-ESI-MS konnten die Molekülmassen einiger Phenolsäuren ermittelt werden, welche anschließend

mittels HSCCC und präparativer HPLC isoliert und charakterisiert werden konnten. Dabei handelte es sich unter anderem um die Phenolsäuren Gallussäure, Vanillinsäure und Protocatechusäure (siehe Kap. 3.4.3.4, 3.4.4.1 und 3.4.4.4). Weiterhin gaben die ESI-MS-Daten Hinweise auf dimere und oligomere Procyanidine, die anhand der Molekülmassen und Fragmentierungen zwar grob identifiziert, jedoch nicht eindeutig charakterisiert werden konnten. Im weiteren Verlauf der Arbeit konnten auch hier einige Procyanidine isoliert und mittels Phloroglucinolyse sowie  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie strukturell aufgeklärt werden.

### 3.4.2 Quantitative Bestimmungen

**Tabelle 9** gibt die Gehalte der Flavonol-O-glykoside in einem methanolischen Silberlindenblütenextrakt an. Die eindeutige Zuordnung erfolgte nach Isolierung und Strukturaufklärung anhand der Retentionszeiten bzw. anhand des Vergleichs der Retentionszeiten mit Referenzsubstanzen. Die Quantifizierung der Flavonoide war aufgrund der hohen Konzentration an Schleimstoffen und der damit verbundenen Gelausbildung im wässrigen Extrakt nicht möglich.

**Tabelle 9:** Gehalte der Flavonol-O-glykoside in Silberlindenblüten in [mg/kg TS]

Peak	Verbindung	$t_R$ [min]	Gehalt [mg/kg TS] im meth. Extrakt
1	Quercetin-3-rutinosid	29,5	631
2	Kämpferol-3-rutinosid	36,7	773
3	Quercetin-dirhamnosid	37,2	539
4	Quercetin-3-glucosid/galactosid	46,4	622
5	Kämpferol-dirhamnosid	48,9	791
6	Quercetin-3-rhamnosid	57,0	762
7	Kämpferol-3-rhamnosid	57,9	410
8	Kämpferol	77,9	476

Neben den Flavonolglykosiden enthalten Silberlindenblüten einen hohen Anteil an Procyanidinen. Einige davon konnten isoliert und charakterisiert werden. Die Dimere B2, B4 und B5 wurden anhand ihrer Retentionszeiten nach einer Methode von ESATBEYOGLU (2011) zugeordnet. In **Tabelle 10** sind die Gehalte der Procyanidine sowie des (-)-Epicatechins in einem methanolischen Extrakt aufgelistet.

**Tabelle 10:** Gehalte des Flavanol (-)-Epicatechin sowie der Procyanidine in Silberlindenblüten in [mg/kg TS]

Peak	Verbindung	$t_R$ [min]	Gehalt [mg/kg TS] im meth. Extrakt
9	(+)-Catechin-4 $\alpha$ →8- (-)- Epicatechin (Dimer B4)*	20,2	1915
10	(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)- Epicatechin (Dimer B2)*	22,3	3084
11	(-)-Epicatechin	28,1	2552
12	(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)- Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)- Epicatechin (Trimer C1)*	30,3	3090
13	(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →6-(-)-	38,0	1447

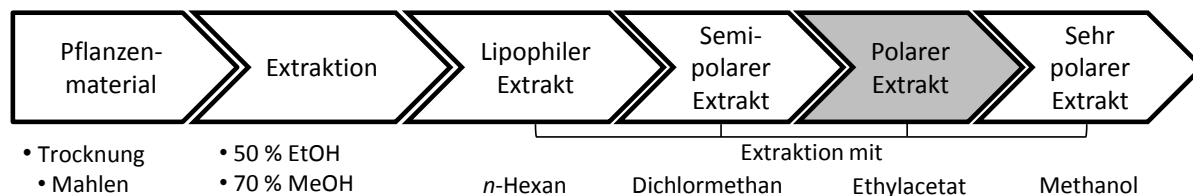
	Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)- Epicatechin*		
14	(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →6-(-)- Epicatechin (Dimer B5)*	51,2	1430

\* angegeben als Epicatechin-Äquivalent

### 3.4.3 Isolierung bekannter sowie unbekannter Verbindungen aus Silberlindenblüten mittels HSCCC

#### 3.4.3.1 Aufarbeitung eines Silberlindenblütenfeinschnitts mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion nach SCHOENFELDT (2010)

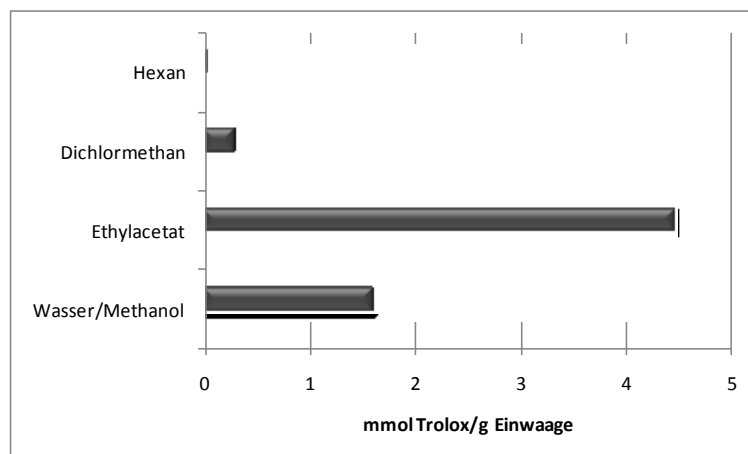
Zur Extraktion der Flavonoide wurde ein Silberlindenblütenfeinschnitt mit 50 % Ethanol bzw. 70 % Methanol extrahiert. Um unerwünschte Stoffe wie Chlorophylle und Fette abzutrennen, wurden beide Extrakte 5-fach mit *n*-Hexan ausgeschüttelt. Im Anschluss wurden die wässrig-alkoholischen Phasen mit Dichlormethan ausgeschüttelt, um semi-polare Verbindungen abzutrennen. Daraufhin erfolgte eine weitere Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat, was zur Extraktion von polaren Verbindungen, wie beispielsweise den Flavonol-O-glykosiden und Procyanidinen führte. In der wässrig-ethanolischen bzw. wässrig-methanolischen Phase kam es zur Anreicherung von sehr polaren Verbindungen, wie beispielsweise den Hydroxyzimtsäurederivaten. Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurden die Extrakte gefriergetrocknet und der polare lyophilisierte Ethylacetatextrakt zur HSCCC eingesetzt.



**Abbildung 58:** Fließschema der Flüssig-Flüssig-Extraktion (nach SCHOENFELDT 2010)

### 3.4.3.2 Antioxidative Aktivität der Phasen aus der Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die nachfolgende **Abbildung 59** zeigt am Beispiel der Flüssig-Flüssig-Verteilung des methanolischen Extraktes die Verteilung der antioxidativen Aktivität innerhalb der einzelnen Phasen.



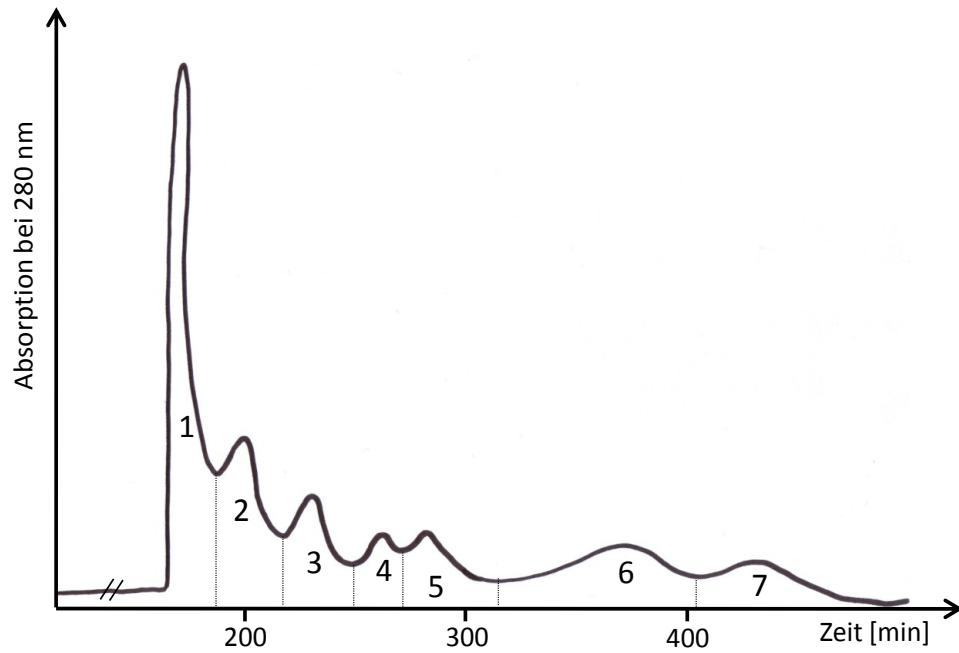
**Abbildung 59:** Antioxidative Aktivitäten [mmol Trolox/g Einwaage] der Phasen nach der Flüssig-Flüssig-Extraktion eines methanolischen Extraktes

Die Abbildung zeigt, dass die Ethylacetatphase der Flüssig-Flüssig-Verteilung die höchste antioxidative Aktivität aller Phasen besitzt. Dies bedeutet, dass sie die höchsten Gehalte an antioxidativ wirksamen Verbindungen wie den Flavonoiden enthält. Zur Identifizierung und Isolierung von potentiell antioxidativ wirksamen Verbindungen aus Silberlindenblüten wurde der gefriergetrocknete Ethylacetatextrakt für die Trennung mittels HSCCC eingesetzt.

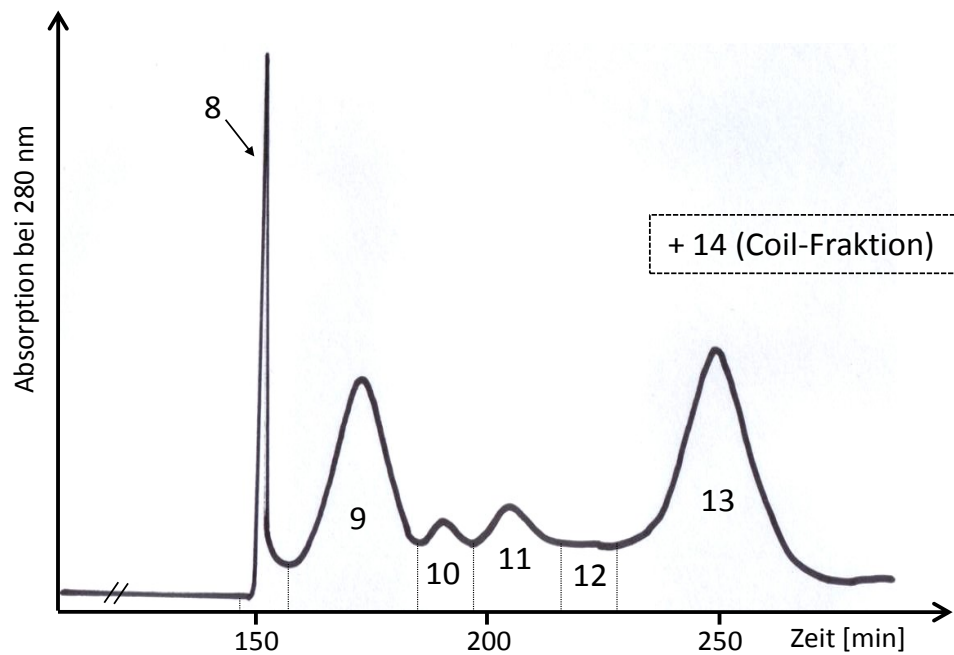
### 3.4.3.3 HSCCC-Trennung eines Ethylacetatextraktes aus der ethanolischen Extraktion („Silb CCC-1“)

Zur Optimierung eines geeigneten Fließmittelsystems für die Fraktionierung eines ethanolischen Silberlindenblüten-Ethylacetatextraktes mittels HSCCC wurden zunächst verschiedene Zusammensetzungen getestet und die Verteilungskoeffizienten  $K$  bestimmt. Der ideale Verteilungskoeffizient  $K$  sollte dabei zwischen 0,5 und 1,0 liegen. Das Fließmittelsystem *tert.* Butylmethylether/Acetonitril/Wasser (5/3/6, v/v/v) erwies sich mit einem Verteilungskoeffizienten von 0,7 als geeignet und wurde somit zur HSCCC mit einer Flussrate von 4 mL/min und einer Rotationsgeschwindigkeit von 800 rpm eingesetzt.

**Abbildung 60 und 61** zeigen die HSCCC-Chromatogramme, aufgenommen bei 280 nm, bei denen hauptsächlich phenolische Säuren, Flavanole und Procyanidine detektiert wurden.

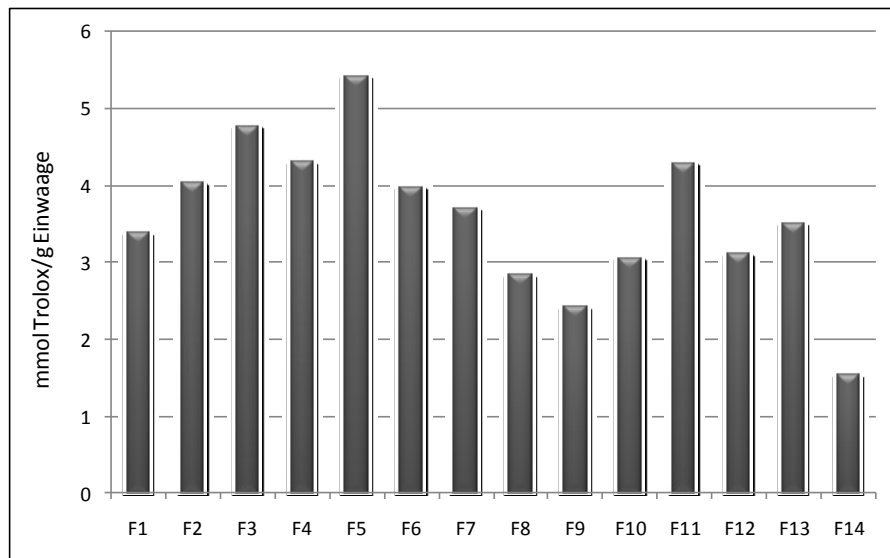


**Abbildung 60:** HSCCC-Chromatogramm des ethanolischen Ethylacetatextraktes aus Silberlindenblüten („Silb CCC-1“) bei 280 nm



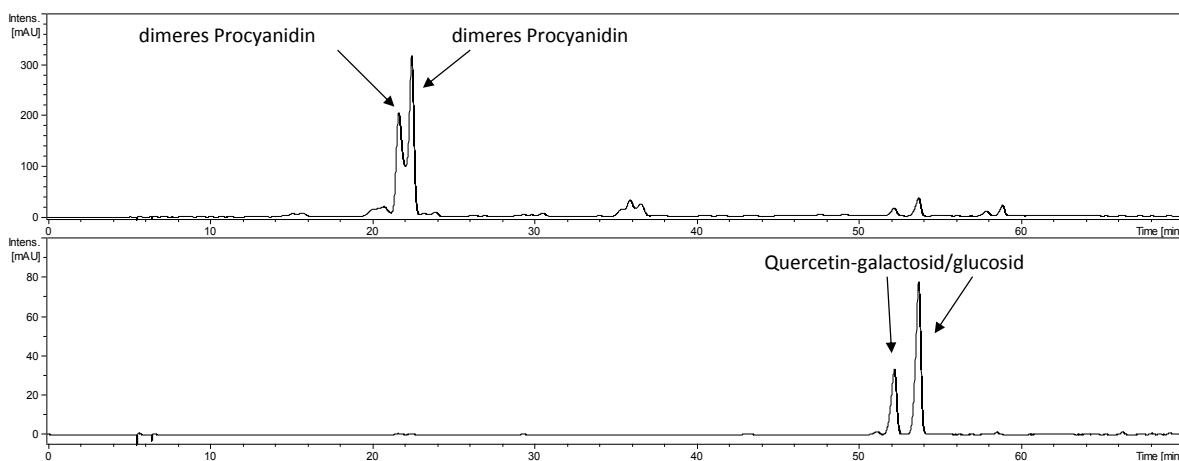
**Abbildung 61:** HSCCC-Chromatogramm der Extrusion des ethanolischen Ethylacetatextraktes aus Silberlindenblüten („EE Silb CCC-1“) bei 280 nm

Nach Entfernung des Lösungsmittels sowie Gefriertrocknung der 14 erhaltenen Fraktionen wurden diese mittels LC-ESI-MS analysiert. Weiterhin wurden alle Fraktionen mittels TEAC-Assay auf ihre antioxidative Aktivität getestet.



**Abbildung 62:** Antioxidative Aktivität der HSCCC-Fractionen des ethanolischen Silberlindenblütenextraktes

Der **Abbildung 62** ist zu entnehmen, dass alle Fraktionen der HSCCC-Trennung mit Ausnahme der Fraktion 14 im Vergleich zum Vitamin-E-Derivat Trolox eine höhere antioxidative Aktivität als 2 aufwiesen. Der zur HSCCC eingesetzte Ethylacetatextrakt wies eine antioxidative Aktivität von 4,44 mmol Trolox/g Einwaage auf, was deutlich macht, dass sich nach der Fraktionierung mittels HSCCC die antioxidative Aktivität auf die einzelnen Fraktionen verteilt hat. In einigen der Fraktionen wie in Fraktion 3, 5 und 15 konnte die antioxidative Aktivität sogar durch Anreicherung von antioxidativen Verbindungen erhöht werden. In **Abbildung 63** sind die HPLC-Chromatogramme der Fraktion 5, welche die höchste antioxidative Wirksamkeit besitzt, bei 280 und 354 nm dargestellt.



**Abbildung 63:** HPLC-Chromatogramme der Fraktion 5 bei 280 nm (oben) und 354 nm (unten)

Die hohe antioxidative Kapazität der Fraktion 5 ist durch die hohe Konzentration an 2 dimeren Procyanidinen zu erklären. In **Abbildung 94** sind die antioxidativen Aktivitäten der innerhalb dieser Arbeit isolierten Procyanidine dargestellt. Anhand dieser Daten ist ersichtlich, dass dimere Procyanidine eine sehr hohe antioxidative Aktivität besitzen. In der Literatur sind bislang nur sehr wenig Daten zur antioxidativen Aktivität von Procyanidinen vorhanden, da Procyanidine in Naturstoffen meist nur als Minorkomponenten vorkommen, daher als Standardsubstanzen nicht erworben werden können und individuell isoliert werden müssen. WIESE (2010) und MUSELIK et al. (2007) belegten das antioxidativ hohe Potential der Procyanidine. Sie gaben für das Dimer B1 ((+)-

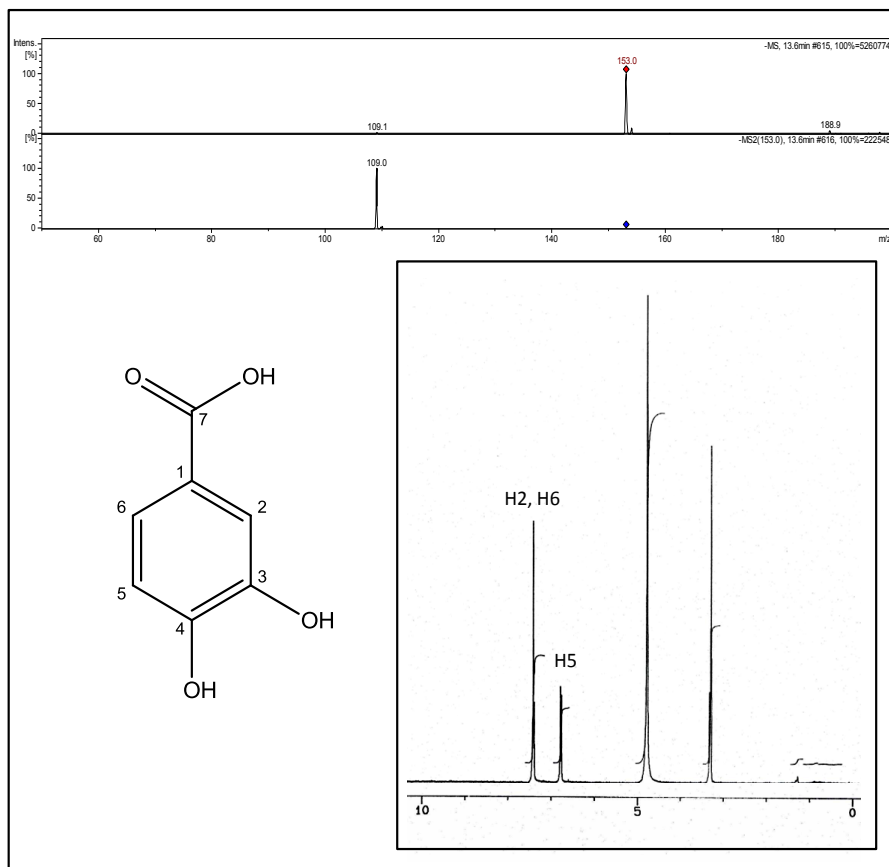
Catechin-4 $\alpha$ →8-(-)-Epicatechin) und das Trimer C1 ((-)-Epicatechin-4→8-(-)-Epicatechin-4→8-(-)-Epicatechin) antioxidative Aktivitäten von etwa 5-6 mmol Trolox/g Einwaage an.

Auch Fraktion 3 der HSCCC-Trennung „Silb CCC-1“ besaß eine deutlich erhöhte antioxidative Aktivität. Diese Fraktion enthielt ebenfalls dimere Procyanidine sowie auch ein trimeres Procyanidin, welches ebenfalls eine hohe antioxidative Aktivität besitzt (siehe **Abbildung 94**). Weiterhin ist in Fraktion 3 ein hoher Gehalt eines Kämpferol-dirhamnosids zu finden. Anhand der innerhalb dieser Arbeit bestimmten antioxidativen Aktivitäten verschiedener Kämpferolglykoside (**Abbildung 94**) kann allerdings abgeschätzt werden, dass das vorliegende Kämpferol-dirhamnosid nur einen sehr geringen Beitrag zur antioxidativen Wirksamkeit der Fraktion leistet.

Fraktion 11 besitzt mit 4,28 mmol Trolox/g Einwaage ebenfalls eine sehr hohe antioxidative Aktivität. Das UV-Chromatogramm bei 280 nm zeigt einen hohen Gehalt an Protocatechusäure in der Fraktion. Auch diese phenolische Säure wurde im Verlauf dieser Arbeit isoliert und anschließend mittels TEAC getestet. Der Test bewies, dass Protocatechusäure mit 5,5 mmol Trolox/g Einwaage eine sehr hohe antioxidative Aktivität besitzt und erklärt somit den hohen antioxidativen Wert dieser HSCCC-Fraktion.

#### 3.4.3.4 Isolierung von Protocatechusäure und (-)-Epicatchin

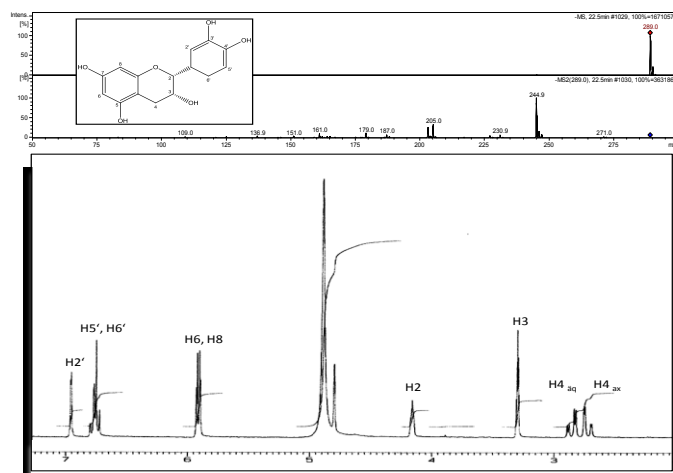
Die Isolierung der Protocatechusäure erfolgte aus den Fraktionen 11 und 12 der HSCCC-Trennung „Silb CCC-1“. Mit einem Gradienten aus 2 %iger Essigsäure und Acetonitril konnte Protocatechusäure in einer Reinheit von 99 % isoliert werden. **Abbildung 64** stellt die Strukturformel, das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum sowie das  $\text{MS}^2$ -Fragmentierungsmuster dar.



**Abbildung 64:** MS sowie  $\text{MS}^2$ -Fragmentierung (oben), Strukturformel (unten links) und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Protocatechusäure

Der Vergleich der Retentionszeiten eines handelsüblichen Protocatechusäurestandards mit der isolierten Verbindung sowie auch das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum haben bewiesen, dass es sich bei der isolierten Verbindung um Protocatechusäure handelte. Eine quantitative Bestimmung im methanolischen bzw. wässrigen Silberlindenblütenextrakt war nicht möglich, da Protocatechusäure bei der HPLC-Trennung zusammen mit einer unbekannten Verbindung eluierte. Auch eine Variierung des Gradienten konnte keine Auftrennung beider Verbindungen erzielen. Protocatechusäure wurde bislang in keiner Literaturstelle als Inhaltsstoff von Silberlindenblüten beschrieben.

Fraktion 8 der HSCCC-Trennung „Silb CCC-1“ wies bei 27,9 min einen Hauptpeak auf, dessen Molekülionenmasse  $m/z$  289  $[\text{M}-\text{H}]^-$  und Fragment  $m/z$  245 auf das Flavan-3-ol (-)-Epicatechin bzw. (+)-Catechin hindeutete. Aufgrund der identischen Molekülmassen und Fragmentierungsmuster konnten die Flavan-3-ole anhand ihrer massenspektrometrischen Daten nicht voneinander unterschieden werden, weshalb nach der Isolierung der Verbindung eine Charakterisierung mittels  $^1\text{H}$ - sowie  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie durchgeführt wurde. Eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit beider Flavanole bestand darin, die Retentionszeiten mit Referenzsubstanzen zu vergleichen. Während (+)-Catechin bereits nach 18,9 min eluierte, wies (-)-Epicatechin eine Retentionszeit von 27,7 min auf. Die in dieser Arbeit isolierte Verbindung eluierte nach 27,9 min, was auf (-)-Epicatechin hindeutete.



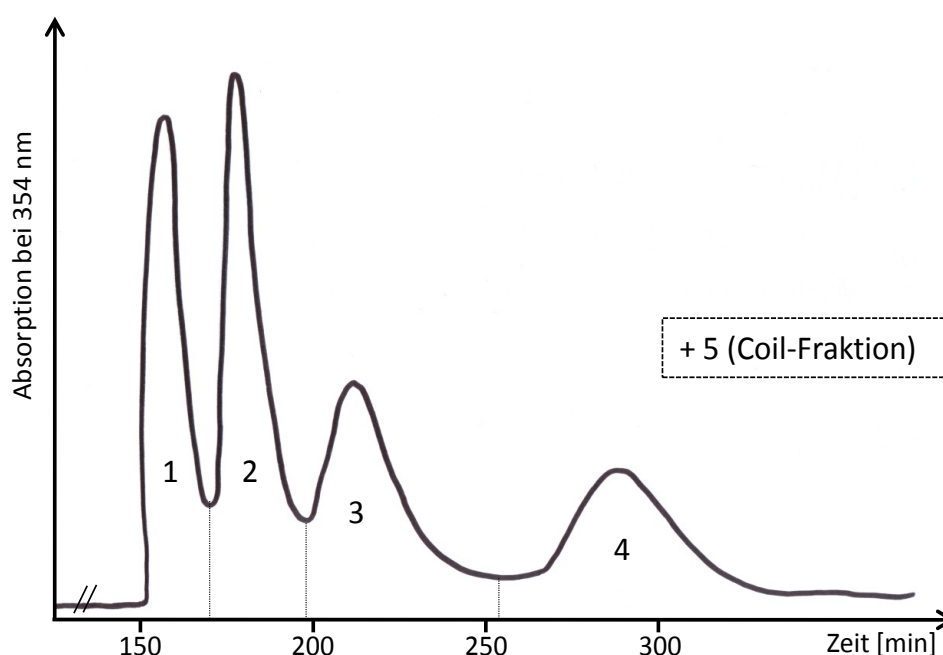
**Abbildung 65:** MS- sowie  $\text{MS}^2$ -Fragmentierung von (-)-Epicatechin bzw. (+)-Catechin (oben) und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) von (-)-Epicatechin (unten)

Anhand des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums konnten weiterhin die spezifischen Signale des Epicatechins identifiziert werden. Neben dem Dublett bei  $\delta$  6,97 ppm ( $J = 1,6$  Hz) für H2' konnten ein Dublett von Dubletts bei  $\delta$  6,80 ppm ( $J = 1,6; 8,2$  Hz) für H6' und ein weiteres Dublett bei  $\delta$  6,75 ppm ( $J = 8,1$  Hz) für H5' zugeordnet werden. Zwei weitere Dubletts bei  $\delta$  5,93 ppm ( $J = 2,5$  Hz) standen für die Protonen H6 und H8. Die beiden Protonen der Methylen-Gruppe an Position 4 spalteten jeweils in Dubletts von Dubletts auf ( $\delta$  2,87 ppm ( $J = 4,5; 16,8$  Hz) für H4<sub>eq</sub> und  $\delta$  2,73 ppm ( $J = 2,7; 16,8$  Hz) für H4<sub>ax</sub>. Zur endgültigen Bestätigung konnten die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale eindeutig dem (-)-Epicatechin zugeordnet werden: C2 ( $\delta$  80,1 ppm), C3 ( $\delta$  68,0 ppm) und C4 ( $\delta$  29,2 ppm).



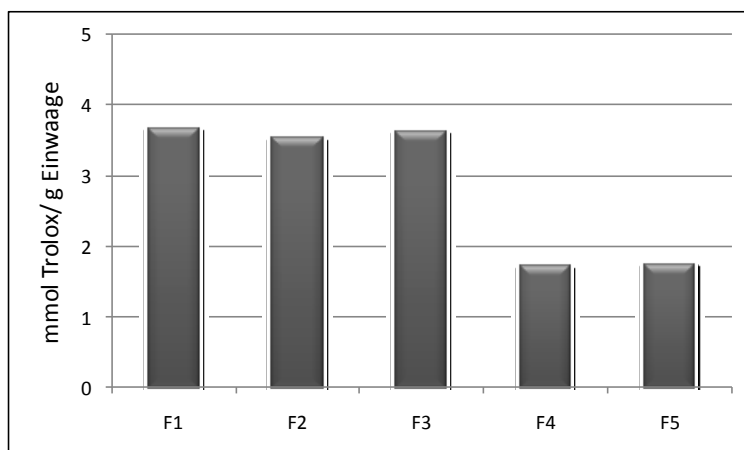
### 3.4.3.5 HSCCC-Trennung eines Ethylacetatextraktes aus der methanolischen Extraktion („Silb CCC-2“)

Zur Auswahl eines geeigneten Fließmittelsystems für die HSCCC-Trennung des methanolischen Extraktes war auch hier eine Testung verschiedener Zusammensetzungen von Lösungsmitteln nötig. Das Fließmittelsystem *n*-Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser (1/5/1/5, v/v/v/v) erwies sich mit einem Verteilungskoeffizienten *K* von 0,8 als bestes System und wurde zur HSCCC eingesetzt. **Abbildung 66** zeigt das Chromatogramm, aufgenommen bei 354 nm mit einem Fluss von 4 mL/min und einer Rotationsgeschwindigkeit von 800 rpm. Bei 354 nm werden hauptsächlich die enthaltenen Flavonol-O-glykoside detektiert.



**Abbildung 66:** HSCCC-Chromatogramm („Silb CCC-2“) des methanolischen Ethylacetatextraktes aus Silberlindenblüten bei 354 nm

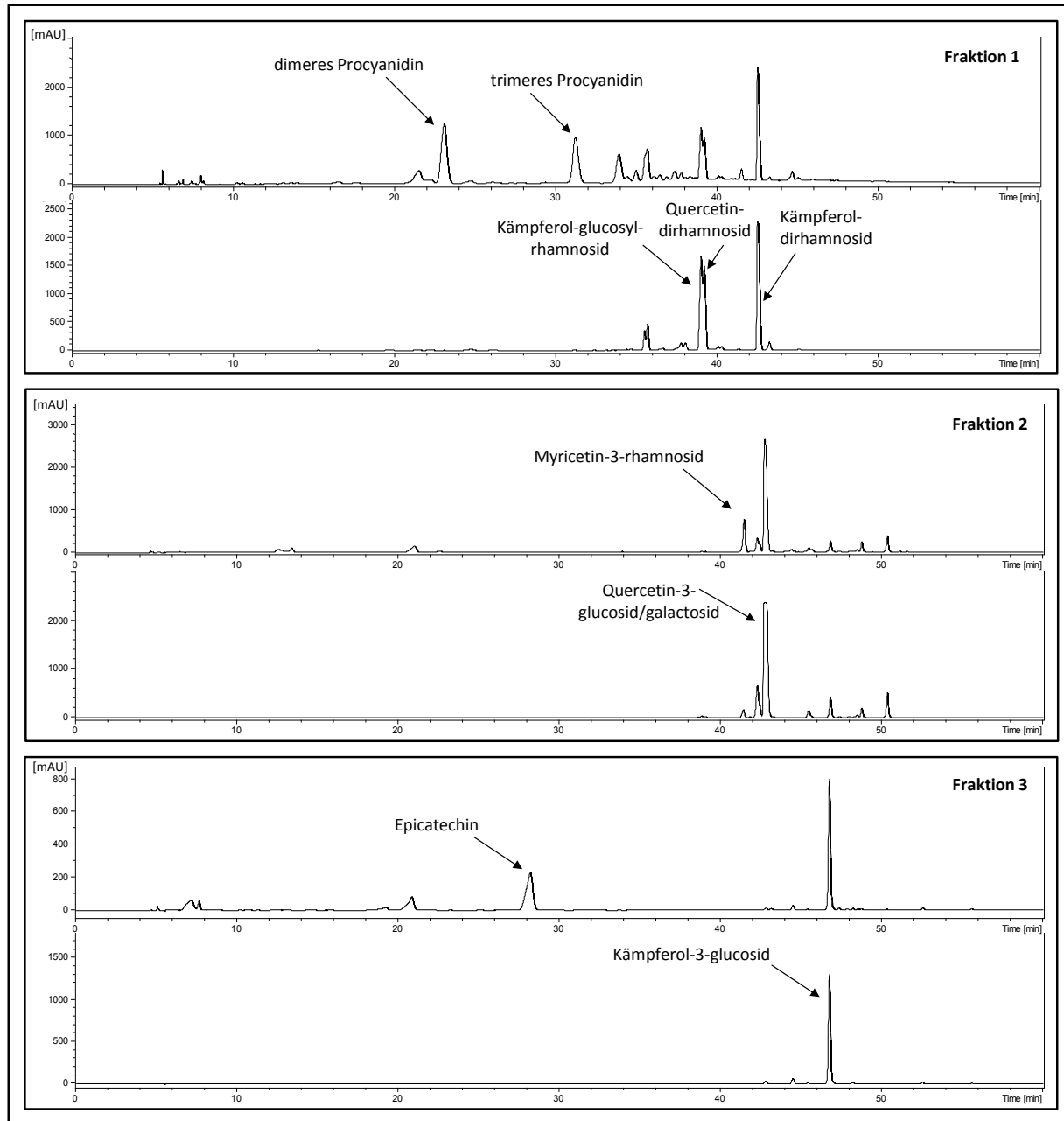
Anhand des UV-Chromatogramms wurden 5 Fraktionen inklusive der auf dem Coil verbliebenen Fraktion erhalten. Zur ersten Übersicht wurden alle Fraktionen mittels LC-ESI-MS untersucht und deren antioxidative Aktivitäten mittels TEAC-Test bestimmt (**Abbildung 67**).



**Abbildung 67:** Antioxidative Aktivität der HSCCC-Fractionen des methanolischen Silberlindenblütenextraktes

Das Diagramm zeigt eine Verteilung der antioxidativen Aktivität auf die Fraktionen 1 bis 3. Alle drei Fraktionen wiesen eine hohe Antioxidativität von  $> 3,5$  mmol Trolox/g Einwaage auf. Fraktion 4 und 5 hingegen lagen mit etwa 1,7 mmol Trolox/g Einwaage deutlich darunter.

In **Abbildung 68** sind die HPLC-Chromatogramme der Fraktionen 1 bis 3 bei 280 sowie 354 nm dargestellt.



**Abbildung 68:** UV-Chromatogramme der Fraktion 1 (oben), Fraktion 2 (mittig) und Fraktion 3 (unten) bei 280 nm (jeweils oben) und 354 nm (jeweils unten)

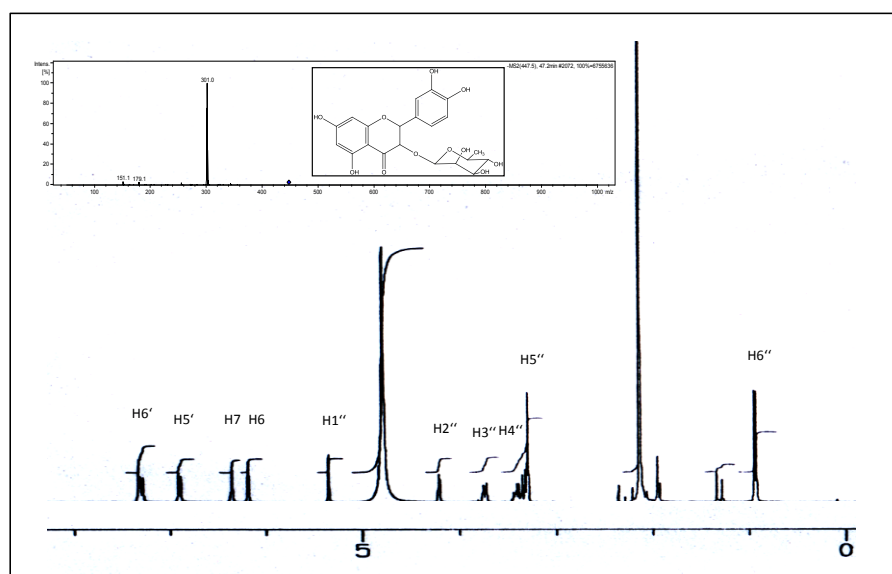
Fraktion 1 der HSCCC-Trennung setzt sich hauptsächlich aus einem dimeren Procyanidin, einem trimeren Procyanidin sowie den Flavonol-O-glykosiden Kämpferol-glucosyl-rhamnosid, Quercetin-dirhamnosid und Kämpferol-dirhamnosid zusammen. Wie **Abbildung 94** zeigt, tragen alle Hauptinhaltsstoffe zur antioxidativen Aktivität bei, wobei die Procyanidine aufgrund ihrer hohen antioxidativen Aktivität den größten Beitrag dazu leisten.

Fraktion 2 enthielt ein Quercetin-3-glucosid bzw.-galactosid als Hauptverbindung, die aufgrund ihrer identischen Fragmentierung anhand der LC-ESI-MS Analyse nicht voneinander unterschieden werden konnten. Mit einer antioxidativen Aktivität von 2 mmol Trolox/g Einwaage konnte das Glucosid bzw. Galactosid nicht allein für den hohen antioxidativen Wert der Fraktion 2 verantwortlich sein. Zudem enthält die Fraktion zu etwa 10 % das Flavonol-O-glykosid Myricetin-3-rhamnosid. Bei der Testung einiger Myricetinstandardverbindungen konnte belegt werden, dass Myricetin und seine Glykoside signifikant höhere antioxidative Kapazitäten besitzen als vergleichbare Kämpferol- oder Quercetinglykoside (siehe **Abbildung 94**). Die erhöhte antioxidative Wirksamkeit lässt sich anhand der zusätzlichen Hydroxylgruppe erklären, da Myricetin am B-Ring statt einfacher (Kämpferol) bzw. zweifacher (Quercetin) Hydroxylierung dreifach hydroxyliert ist. RICE-EVANS et al. (1996) beschrieben ebenfalls den Zusammenhang zwischen antioxidativer Aktivität und Zahl der Hydroxygruppen des antioxidativ wirksamen Moleküls.

Die hohe antioxidative Aktivität von Fraktion 3 kann zum großen Teil durch das Flavanol (-)-Epicatechin erklärt werden, da für (-)-Epicatechin eine hohe Antioxidativität von 5,6 mmol Trolox/g Einwaage bestimmt werden konnte. Kämpferol-3-glucosid als weitere Hauptverbindung dieser Fraktion besitzt mit 0,8 mmol Trolox/g Einwaage im Vergleich zum (-)-Epicatechin nur eine vernachlässigbar geringe antioxidative Aktivität.

#### 3.4.3.6 Isolierung von Quercetin-3-rhamnosid

Aus Fraktion 4 der „Silb CCC-2“-Trennung konnte mittels präparativer HPLC das Quercetin-3-rhamnosid isoliert werden. Anhand des Pseudomolekülions von  $m/z$  447  $[M-H]^-$  und des Fragmentes  $m/z$  301 wurde bereits vor Isolierung der Verbindung vermutet, dass es sich bei der Verbindung um ein Quercetinrhamnosid handelt. Nach Isolierung der Verbindung wurde die Struktur mittels  $^1\text{H}$ -NMR- sowie  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie vollständig aufgeklärt.



**Abbildung 69:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Quercetin-3-O-rhamnosid (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

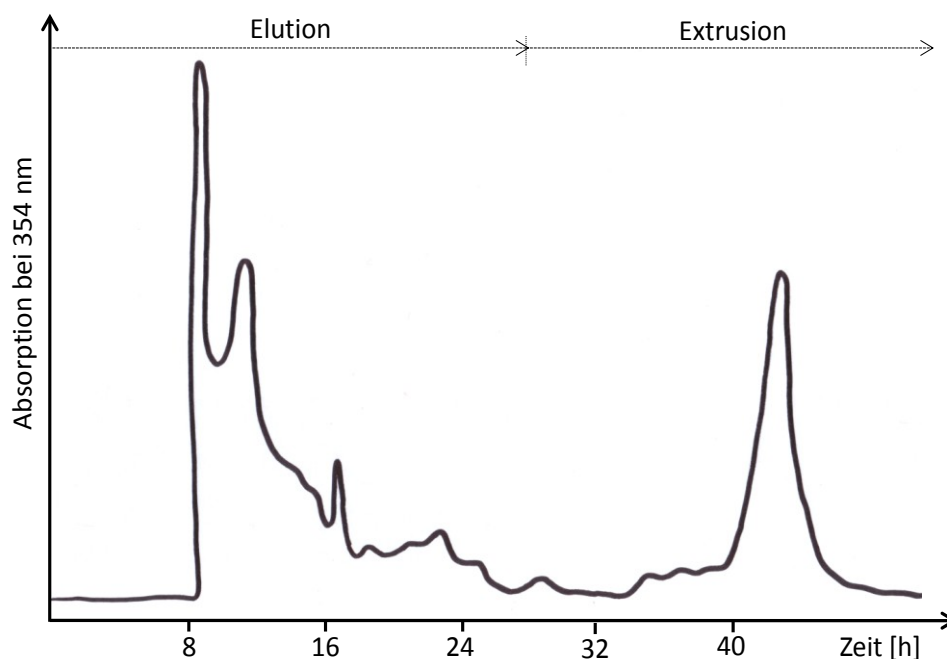
Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigte die für das Aglykon Quercetin typischen Protonensignale im Bereich zwischen  $\delta$  7,34 und 6,20 ppm. Im Bereich  $\delta$  5,36-0,95 ppm befanden sich die Signale der Zuckerprotonen H1'' bis H6''. Das Dublett bei  $\delta$  5,36 ppm ist dem anomeren H1'' Proton der Rhamnose zuzuordnen und konnte aufgrund der kleinen Kopplungskonstante von 1,3 Hz der in der Natur häufig vorkommenden  $\alpha$ -L-Rhamnose zugeordnet werden. Alle  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten sind in Kap. 5.4 aufgelistet.

Aufgrund der geringen Ausbeuten der Fraktionen der HSCCC-Trennungen konnten keine Minorkomponenten aus Silberlindenblüten isoliert werden. Aus diesem Grund wurde die bereits erfolgreich durchgeführte HSCCC-Trennung auf einen größeren Maßstab unter Anwendung der Spiral-Coil LSRCCC übertragen. Mit Hilfe dieser präparativen Trennmethode war es möglich, 10 g Probenmaterial mit nur einer Trennung zu fraktionieren.

#### **3.4.4 Erstmaliger Einsatz der Spiral-Coil LSRCCC zur Isolierung bislang unbekannter Verbindungen aus Silberlindenblüten**

Nach erfolgreicher Fraktionierung der Polyphenole mittels HSCCC wurde die Trennung auf einen grösseren Maßstab übertragen. Dazu wurde die Spiral-Coil LSRCCC eingesetzt. Damit war es möglich, höhere Ausbeuten der Fraktionen sowie eine Anreicherung von Minorbestandteilen zu erzielen. Für die Trennung wurden etwa 10 g des Ethylacetatextraktes eingesetzt. Als Fließmittelsystem wurde ebenfalls wie bei der „Silb CCC-2“ das Fließmittelsystem tert. Butylmethylether/Acetonitril/Wasser (5/3/6, v/v/v) verwendet. Die von KÖHLER (2006) durchgeführte Retentionsstudie mit dem genannten Fließmittelsystem zeigte, dass eine optimale Trennung im L-I-H-Modus mit der Flussrate 5 mL/min und einer Rotationsgeschwindigkeit von 132 U/min durchzuführen ist. So wurde die Trennung unter Anwendung dieser Parameter durchgeführt. Nach 28 Stunden wurde die Trennung abgebrochen und im „Extrusion“ Modus weitergeführt, d.h. die leichte stationäre Phase als mobile Phase verwendet, um die auf dem Coil verbliebenen unpolaren Verbindungen fraktioniert auszuspülen.

Das UV-Chromatogramm der Trennung ist in **Abbildung 70** bei einer Wellenlänge von 354 nm dargestellt.



**Abbildung 70:** UV-Chromatogramm der Spiral-Trennung des Ethylacetatextraktes aus Silberlindenblüten bei 354 nm nach SCHOENFELDT (2010)

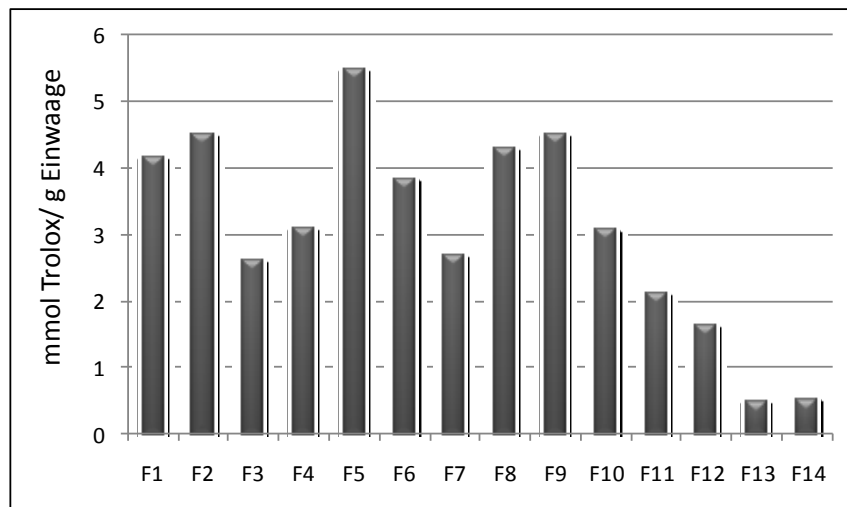
Zusätzlich zum UV-Chromatogramm wurde jedes 3. Reagenzglas der Trennung mittels HPLC-DAD analysiert, um eine genauere Einteilung der sich in ihrer Zusammensetzung stark unterscheidenden Fraktionen vornehmen zu können. Nach dem Vergleich zwischen UV-Chromatogramm und den einzelnen HPLC-Chromatogrammen wurden 14 Fraktionen eingeteilt. In **Tabelle 11** sind die Ausbeuten der einzelnen Fraktionen in mg angegeben.

**Tabelle 11:** Ausbeuten der Fraktionen der Spiral-Coil-Trennung des Silberlindenblütenextraktes nach SCHOENFELDT (2010)

Fraktion	Ausbeute [mg]
1	5102
2	510
3	207
4	407
5	305
6	299
7	142
8	107
9	125
10	201
11	65
12	86
13	441
14	155

Bereits mehr als 50 % des eingesetzten Ethylacetatextraktes waren in Fraktion 1 der Trennung zu finden. Die LC-ESI-MS Analyse dieser Fraktion zeigte, dass die Zusammensetzung noch sehr komplex war. Neben verschiedenen Procyanidinen sind auch mehrere Flavonol-O-glykoside enthalten. Die Trennung mittels der Spiral-Coil LSRCCC diente daher nur dem Zwecke der Vorfraktionierung und Fraktion 1 wurde mittels HSCCC weiter aufgetrennt (siehe Kap. 3.4.5).

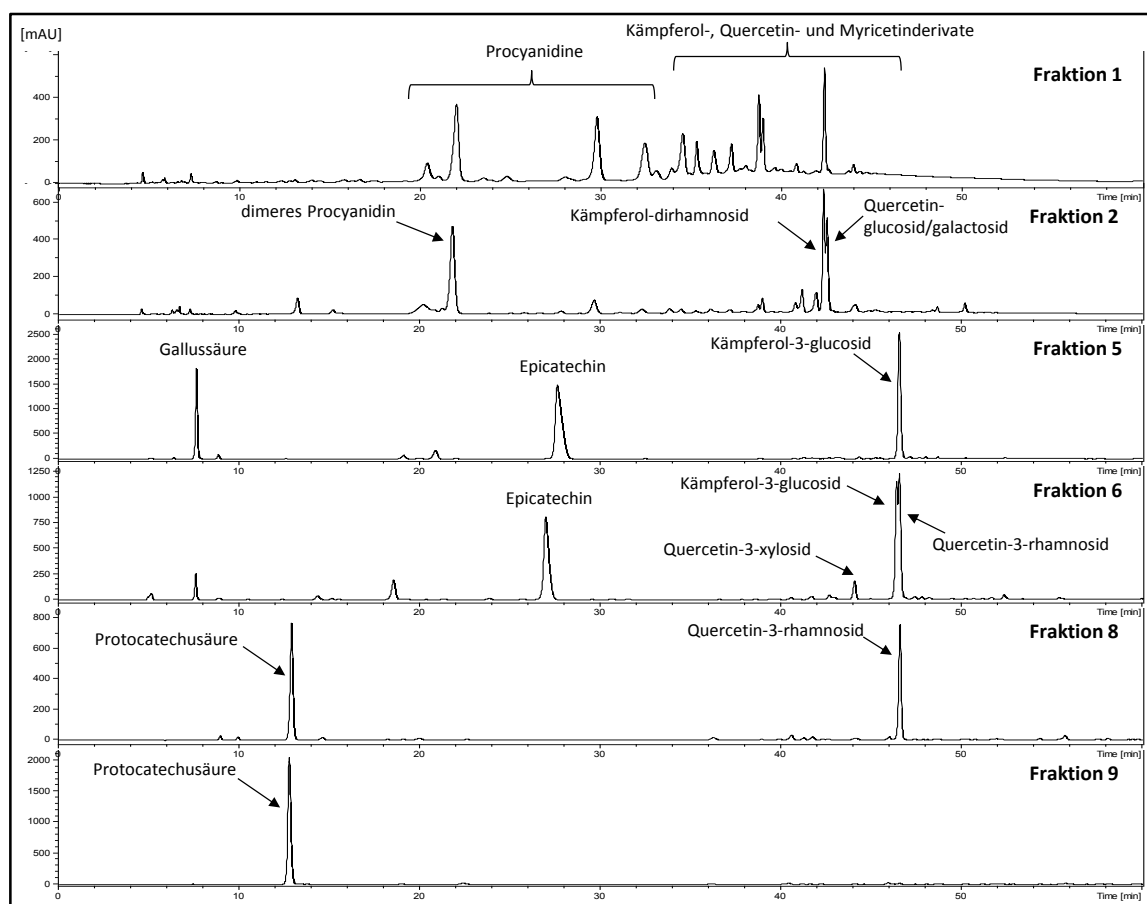
Alle Fraktionen der Spiral-Trennung wurden nach Gefriertrocknung mittels LC-ESI-MS untersucht und ebenfalls deren antioxidative Aktivitäten bestimmt. Die Ergebnisse des TEAC-Tests sind in **Abbildung 71** dargestellt.



**Abbildung 71:** Antioxidative Aktivitäten der Fraktionen der Spiral-Coil nach SCHOENFELDT (2010)

Anhand der Abbildung ist zu erkennen, dass die antioxidativen Kapazitäten sehr unterschiedlich auf die einzelnen Fraktionen verteilt sind. Während Fraktion 5 mit 5,5 mmol Trolox/g Einwaage die höchste Aktivität besitzt, liegen Fraktionen 13 und 14 mit etwa 0,5 mmol Trolox/g Einwaage weit darunter. Während in Fraktion 13 und 14 nur noch sehr geringe Gehalte verschiedener Kämpferolglykoside zu finden sind, enthalten die antioxidativ wirksamen Fraktionen 1, 2, 5, 6, 8 und 9 hohe Mengen an Epicatechin, phenolischen Säuren, Proanthocyanidinen und verschiedenen Flavonol-O-glykosiden.

In **Abbildung 72** sind die UV-Chromatogramme dieser Fraktionen bei 280 nm dargestellt.

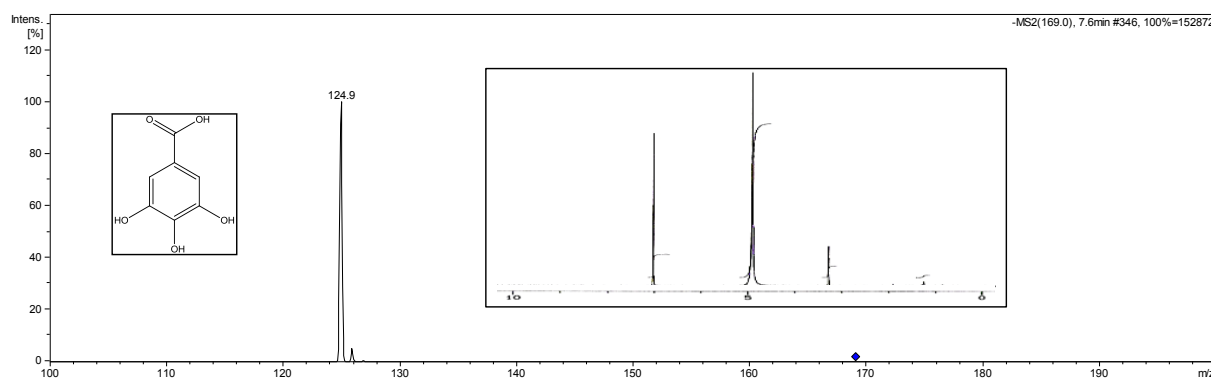


**Abbildung 72:** UV-Chromatogramme der antioxidativen Fraktionen 1, 2, 5, 6, 8 und 9 bei 280 nm

Um die hohen antioxidativen Aktivitäten der aufgeführten Fraktionen genauer erklären zu können und die dafür verantwortlichen Verbindungen ausfindig zu machen, wurden Hauptinhaltsstoffe der antioxidativ hoch wirksamen Fraktionen isoliert. Anschließend wurden deren antioxidative Aktivitäten mittels TEAC bestimmt (siehe **Abbildung 94**).

### 3.4.4.1 Isolierung von Gallussäure

Im UV-Chromatogramm der Fraktion 5 der Spiral-Coil-Trennung eluierte bei 7,7 min eine der Hauptverbindungen, welche ein Pseudomolekülion von  $m/z$  169  $[M-H]^-$  und Fragment von  $m/z$  125 aufwies. Die Absorptionsmaxima der Verbindung lagen bei 228 und 270 nm. Nach Isolierung der Verbindung mittels präparativer HPLC konnte anhand der  $^1H$ -NMR-Spektroskopie die Verbindung als Gallussäure (3,4,5-Trihydroxybenzoesäure) identifiziert werden.

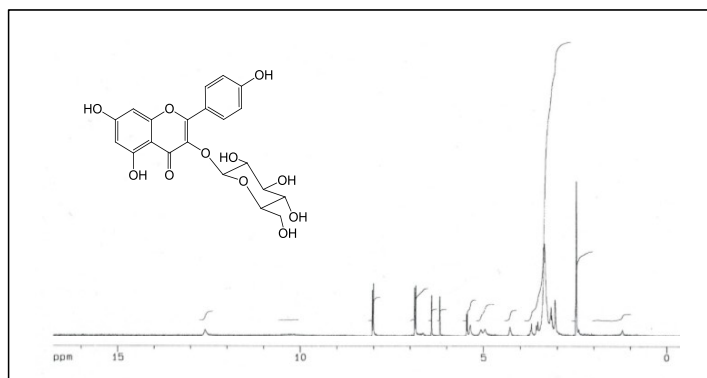


**Abbildung 73:** MS<sup>2</sup>-Spektrum, <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum und Strukturformel der 3, 4, 5-Trihydroxybenzoesäure (Gallussäure)

### 3.4.4.2 Isolierung von Kämpferol-3-glucosid und Quercetin-3-xylosid

Aus Fraktion 6 der Spiral-Coil-Trennung konnten nach erfolgreicher Entwicklung eines Gradienten für die präparative HPLC zwei Flavonol-O-glykoside isoliert werden.

Beim ersten Flavonol-O-glykosid, das bei 46,4 min eluierte, ergab die ESI-MS<sup>n</sup>-Analyse das Molekülion m/z 447 [M-H]<sup>-</sup> und das MS<sup>n</sup>-Fragment m/z 285, das auf das Aglykon Kämpferol bzw. Luteolin hindeutete. Die Differenz von m/z 162 deutete außerdem auf die Abspaltung eines Hexosids hin. Anhand der spezifischen Fragmentierungsmuster von Luteolin und Kämpferol, die von FABRE et al. (2001) beschrieben wurden, konnten die MS<sup>3</sup>-Daten dem Aglykon Kämpferol zugeordnet werden, was auch die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten bestätigten.



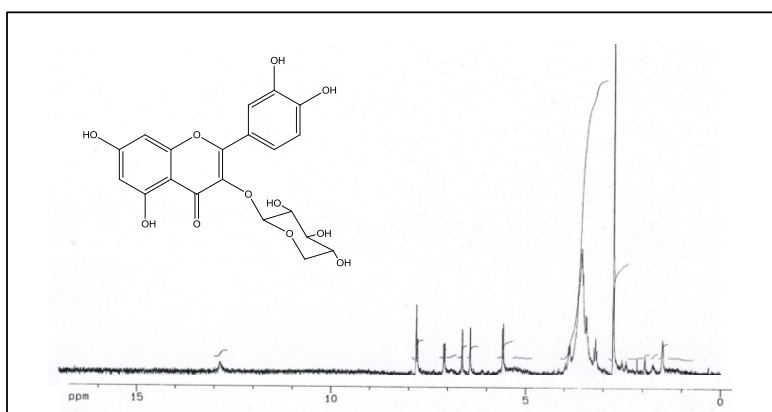
**Abbildung 74:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum sowie Strukturformel von Kämpferol-3-glucosid

Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum zeigte im Aromatenbereich die für Flavonoide typischen Signale. Die beiden meta-ständigen Protonen H6 und H8 spalteten jeweils in Dubletts bei 6,2 und 6,4 ppm auf und koppelten mit der für meta-Kopplungen typischen Kopplungskonstante von J = 1,8 Hz. Zwei weitere Signale entsprachen den vier Protonen des B-Ringes, der einen para-substituierten Aromaten darstellte. Aufgrund der chemischen Identität von H3' und H5' (δ 6,9 ppm) sowie H2' und H6' (δ 8,0 ppm) spalteten diese jeweils in ein Dublett auf, wobei sie für zwei Protonen integrierten. Die ortho-Kopplung zwischen H2' und H3' bzw. H5' und H6' betrug 8,8 Hz. Im Bereich zwischen 3,1-3,8 ppm lagen die Signale der Glucose als Multiplett. Das anomere Proton H1'' spaltete in ein Dublett bei 5,31 ppm und einer Kopplungskonstante von 7,8 Hz auf, was für eine β-glykosidische Bindung des Zuckers spricht. Anhand der Zuckersignale im <sup>1</sup>H-NMR war keine eindeutige Aufklärung des Zuckers Glucose bzw. Galactose möglich, weshalb mittels HPLC-DAD-Analyse die Referenzsubstanz Kämpferol-3-glucosid mit der isolierten Substanz verglichen wurde. Es ergaben sich identische



Retentionszeiten bei 46,4 min, was die isolierte Verbindung als Kämpferol-3-glucosid charakterisierte. Nach ESATBEYOGLU (2011) eluiert Kämpferol-3-galactosid vor dem Kämpferol-3-glucosid.

Aus Fraktion 6 der Spiral-Coil-Trennung konnte weiterhin eine Verbindung isoliert werden, deren Absorptionsspektrum bei 356 nm ein Maximum zeigte. Das innerhalb der ESI-MS<sup>n</sup>-Analyse ermittelte Molekülion  $m/z$  433  $[M-H]^-$  und das Fragment  $m/z$  301  $[M-H-Pentose]^-$  deuteten darauf hin, dass es sich bei der isolierten Verbindung um das Aglykon Quercetin handelte, welches aufgrund der Abspaltung von  $m/z$  132 mit einer Pentose verknüpft sein musste. Nach Isolierung der Verbindung mittels präparativer HPLC wurde die Struktur der Verbindung mittels <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie aufgeklärt.



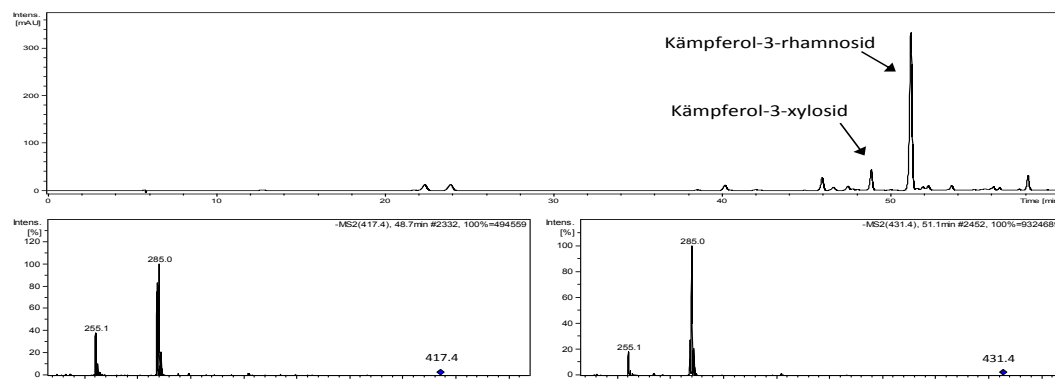
**Abbildung 75:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum sowie Strukturformel des Quercetin-3-xylosids

Anhand der Signale im Tieffeld konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem Aglykon um das Flavonol Quercetin handelte. Die Signale der Protonen H6' und H2' des B-Ringes fielen bei einer chemischen Verschiebung von 7,5 ppm zusammen. Es folgten die Protonensignale des H5' ( $\delta$  6,8 ppm), H8 ( $\delta$  6,4 ppm) und H6 ( $\delta$  6,2 ppm). Das anomere Protonensignal des H1'' bei 5,3 ppm sowie die Kopplungskonstante  $J = 7,0$  Hz deuteten auf einen  $\beta$ -glykosidisch gebundenen Zucker hin. Die Signale des Zuckers spalteten in ein Multiplett zwischen 2,9 – 3,6 ppm auf und waren den einzelnen Protonen nur begrenzt zuzuordnen. Das Signal des H5''a, welches die äquatoriale Stellung einnahm, konnte der chemischen Verschiebung bei 3,7 ppm zugeordnet werden und gibt anhand seiner großen Kopplungskonstante von 10,4 Hz einen eindeutigen Hinweis auf Xylose als verknüpften Zucker. Würde es sich bei dem vorliegenden Zucker um Arabinose handeln, würde das Proton H5''a aufgrund des äquatorial stehenden H4'' Protons eine kleinere Kopplungskonstante von etwa 5 Hz aufweisen (HILLEBRAND, 2004). Zusätzlich war es anhand einer Referenz des Quercetin-3-arabinosids möglich, die Retentionszeiten eines Xylosids und Arabinosids zu vergleichen und die Verbindung als Quercetin-3-xylosid zu bestätigen.

#### 3.4.4.3 Isolierung von Kämpferol-3-rhamnosid und Kämpferol-3-xylosid

Neben dem Flavonol-O-glykosid Kämpferol-3-rhamnosid, welches zu einem hohen Anteil in Silberlindenblüten enthalten ist und in der Literatur bereits als Inhaltsstoff beschrieben wurde (MATSUDA et al., 2002), konnte ein weiteres Kämpferolglykosid, welches nur zu einem sehr geringen Anteil in den Blüten enthalten ist, isoliert werden. Die Analyse mittels ESI-MS<sup>n</sup> ergab für das

Kämpferol-3-rhamnosid ein Molekölion von  $m/z$  431  $[M-H]^-$  sowie das Fragment  $m/z$  285  $[M-H-Rhamnose]^-$ . Das Molekölion des zweiten Glykosids  $m/z$  417  $[M-H]^-$  und das Hauptfragment  $m/z$  285  $[M-H-Pentose]^-$  wiesen auf das Aglykon Kämpferol hin, welches aufgrund der Abspaltung von  $m/z$  132 mit einer Pentose verknüpft sein musste.

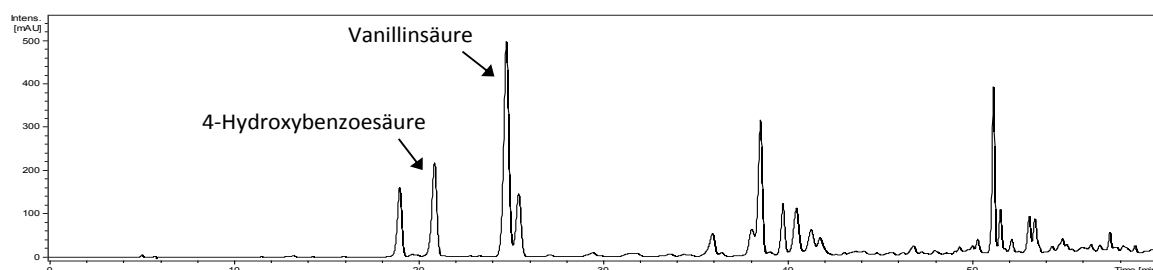


**Abbildung 76:** HPLC-Chromatogramm der Fraktion 10 der Spiral-Coil-Trennung bei 354 nm (oben) sowie MS<sup>2</sup>-Spektren des Kämpferol-3-rhamnosids (rechts) sowie des Kämpferol-3-xylosids (links)

Anhand der Retentionszeit sowie der MS<sup>n</sup>-Daten konnte Kämpferol-3-rhamnosid eindeutig identifiziert werden. Auf eine zusätzliche Absicherung der Struktur mittels NMR-Spektroskopie wurde verzichtet. Das Flavonolglykosid Kämpferol-3-xylosid ist bislang als Inhaltsstoff von Silberlindenblüten nicht bekannt. Die <sup>1</sup>H-NMR-Daten bestätigten trotz kleiner Verunreinigungen im Spektrum im Bereich  $\delta$  6,1–8,0 ppm das Aglykon Kämpferol mit den Signalen des B-Ringes, die aufgrund ihrer chemischen Identität in nur 2 Dubletts aufspalteten ( $\delta$  8,0 ppm, mit  $J = 8,9$  Hz für H2' und H6' sowie  $\delta$  6,9 ppm mit  $J = 8,8$  Hz für H3' und H5') und den Protonen des A-Ringes H8 ( $\delta$  6,3 ppm) und H6 ( $\delta$  6,1 ppm). Der verknüpfte Zucker, ein Pentosid, ist wieder in ein Multipllett im Bereich  $\delta$  2,9-3,8 ppm aufgespalten. Die Signale der Protonen H5''a und H5''b sind jedoch gut zuzuordnen. Das axiale Proton H5''b spaltet in ein Dublett von Dublett auf und koppelt mit den Kopplungskonstanten 9,7 Hz sowie 11,4 Hz. Die großen Kopplungskonstanten sprechen für eine Xylose als verknüpften Zucker, da es aufgrund des axial ständigen Protons H4'' zu den angegeben großen Kopplungskonstanten kommt. HILLEBRAND (2004) beschrieb ebenfalls das Auftreten von großen Kopplungskonstanten bei der Verknüpfung mit Xylose, während bei der Verknüpfung mit einer Arabinose kleinere Kopplungskonstanten von 6,5 und 10,5 Hz auftraten.

#### 3.4.4.4 Isolierung von 4-Hydroxybenzoesäure und Vanillinsäure

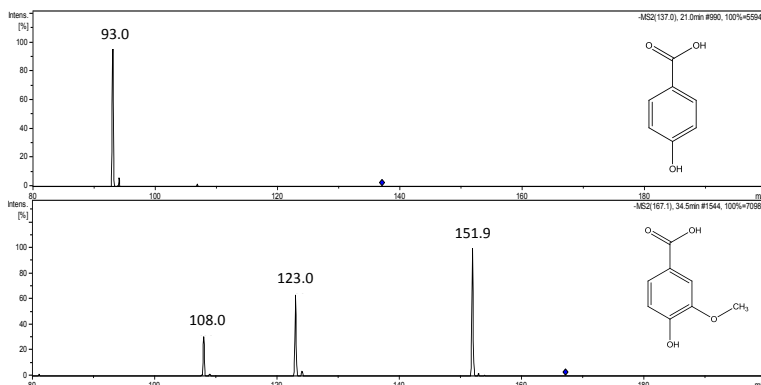
Aus Fraktion 12 der Spiral-Coil-Trennung konnten mittels präparativer HPLC zwei Verbindungen isoliert werden, die bei den Retentionszeiten 20,9 und 24,7 min eluierten (**Abbildung 77**).



**Abbildung 77:** HPLC-Chromatogramm der Fraktion 12 der Spiral-Coil Trennung bei 280 nm

Für die bei 20,9 min eluierende Verbindung ergab die ESI-MS<sup>n</sup>-Analyse das Molekölion m/z 137 [M-H]<sup>-</sup> und das Fragment m/z 93 (**Abbildung 78**). Dessen Absorptionsmaximum lag bei 254 nm. Die ermittelten Daten wiesen auf eine einfach hydroxylierte Benzoessäure hin. Das MS<sup>2</sup>-Fragment m/z 93 entstand durch die Abspaltung der Carboxylgruppe (COOH). Nach Zusatz eines 4-Hydroxybenzoessäure-Standards wurde bestätigt, dass es sich bei der isolierten Verbindung um 4-Hydroxybenzoessäure handelte, die in der Literatur ebenfalls als Inhaltsstoff von Silberlindenblüten bislang nicht beschrieben wurde. Auch die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Spektren bestätigten ebenfalls die Struktur der Benzoessäure, die in para-Stellung eine Hydroxylgruppe trägt.

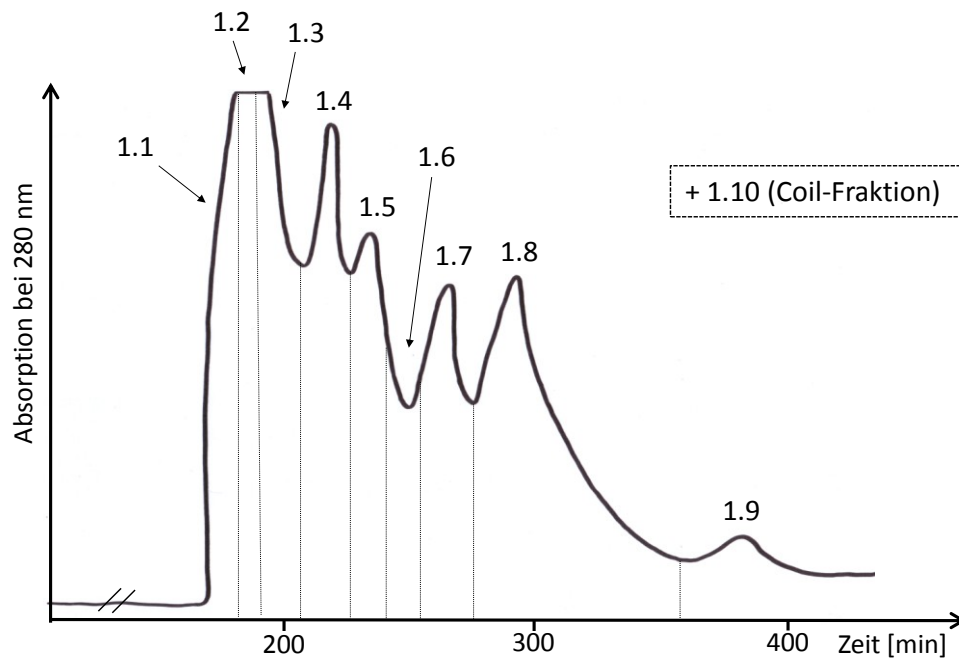
Die bei 24,7 min eluierende Verbindung zeigte in der ESI-MS<sup>n</sup>-Analyse ein Molekölion bei m/z 167 [M-H]<sup>-</sup> und ein Absorptionsmaximum von 260 nm. Anhand der massenspektrometrischen Daten wurde vermutet, dass es sich bei der Verbindung um 4-Hydroxy-3-methoxybenzoessäure (Vanillinsäure) handelte. Die MS<sup>2</sup>-Fragmente m/z 152 [M-H-CH<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, m/z 123 [M-H-COOH]<sup>-</sup> und m/z 108 [M-H-CH<sub>3</sub>-COOH]<sup>-</sup> (**Abbildung 78**) bestätigten diese Vermutung. Ein Retentionszeitenvergleich mit der Referenzsubstanz Vanillinsäure bestätigt dies ebenfalls. Zudem stimmten auch die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Daten mit den Referenzdaten überein.



**Abbildung 78:** MS<sup>2</sup>-Spektren der 4-Hydroxybenzoessäure (oben) und Vanillinsäure (unten) im neg. Modus sowie deren Strukturformeln

### 3.4.5 HSCCC-Trennung der Fraktion 1 aus der Spiral-Coil LSRCCC („Silb CCC-3“)

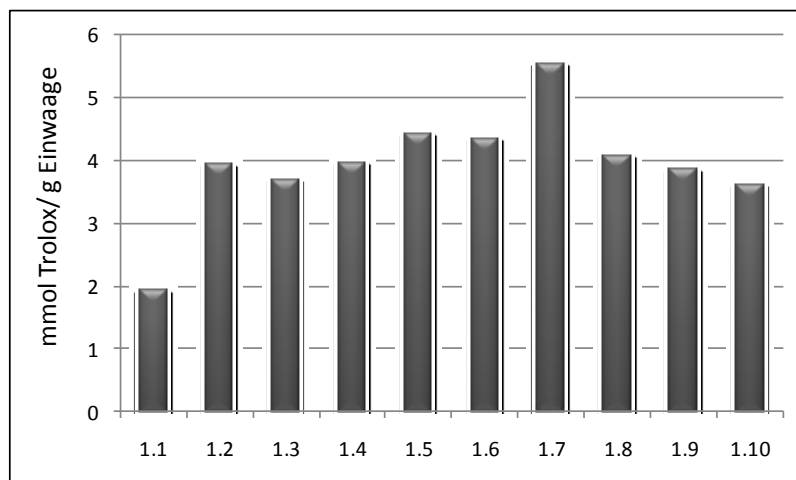
Aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Fraktion 1 der Spiral-Coil-Trennung, der darin angereicherten Procyanidine und der hohen Ausbeute dieser Fraktion, wurde eine weitere Auftrennung mittels HSCCC angestrebt. Dafür wurde das Fließmittelsystem Ethylacetat/*n*-Butanol/Wasser (14/1/15, v/v/v) ausgewählt. Die Trennung wurde mit einer Flussrate von 4 mL/min und einer Rotationsgeschwindigkeit von 800 rpm durchgeführt. Für die Detektion der Procyanidine erfolgte die Aufzeichnung bei 280 nm. In **Abbildung 79** ist das Chromatogramm der Trennung dargestellt.



**Abbildung 79:** HSCCC-Chromatogramm („Silb CCC-3“) der Fraktion 1 der Spiral-Coil Trennung bei 280 nm nach SCHOENFELDT (2010)

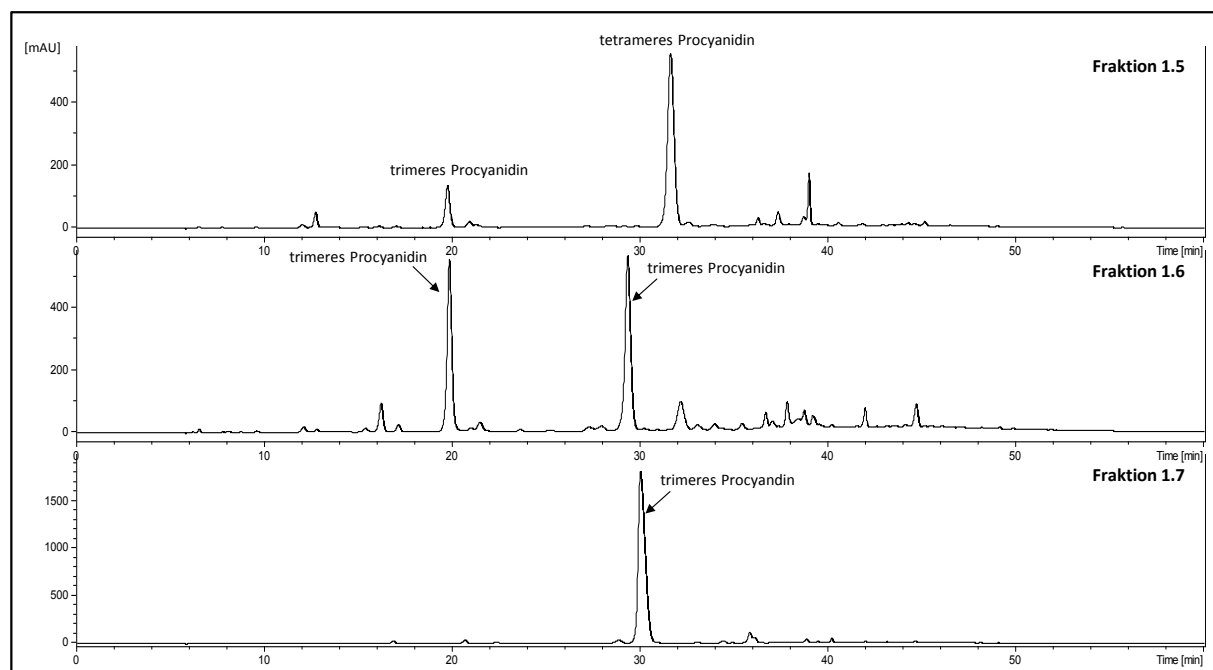
Anhand des UV-Chromatogramms konnten 10 Fraktionen inklusive der Coil-Fraktion erhalten werden.

**Abbildung 80** stellt die ermittelten antioxidativen Aktivitäten der einzelnen Fraktionen dar.



**Abbildung 80:** Antioxidative Aktivitäten der HSCCC-Fractionen der Fraktion 1 der Spiral-Coil-Trennung

Wie die Abbildung zeigt, sind die antioxidativen Aktivitäten überwiegend gleichmäßig auf die Fraktionen verteilt. Untersucht man die qualitative Zusammensetzung der Fraktionen mittels LC-ESI-MS, wird deutlich, dass die Procyanidine mit Hilfe der HSCCC sehr gut fraktioniert werden konnten. Die Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten, Fraktion 1.5, 1.6 und 1.7, enthalten dimere und trimere Procyanidine in stark angereicherter Form. **Abbildung 81** stellt die UV-Chromatogramme dieser Fraktionen bei 280 nm dar. Anhand der Hauptmassen und der typischen Fragmentierungsmuster konnte bestimmt werden, ob es sich um ein dimeres ( $m/z$  577  $[M-H]^-$ ), trimeres ( $m/z$  865  $[M-H]^-$ ) oder tetrameres ( $m/z$  1153  $[M-H]^-$ ) Procyanidin handelte.



**Abbildung 81:** HPLC-Chromatogramme der Fraktionen 1.5, 1.6 und 1.7 bei 280 nm

Die in den einzelnen Fraktionen angereicherten Procyanidine konnten mittels präparativer HPLC isoliert werden. Deren Struktur konnte nicht allein anhand der Analyse mittels LC-ESI-MS<sup>n</sup> aufgeklärt werden, da dabei nur die Bestimmung des Polymerisationsgrades anhand der Hauptmassen möglich war, jedoch keine Informationen über die Art der Interflavanoidbindung gewonnen werden konnte. Mit Hilfe der säurekatalysierten Degradation (Phloroglucinolyse) konnten erste Erkenntnisse über die einzelnen Bausteine der Procyanidine erhalten und die Struktur anschließend mit Hilfe der ein- und zweidimensionalen <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden.

Die Durchführung der Phloroglucinolyse ermöglicht durch Spaltung die Bestimmung der einzelnen Flavan-3-ol-Bausteine in einem Procyanidinmolekül. Anhand der unterschiedlichen Spaltgeschwindigkeiten kann außerdem auch die Art der Interflavanoidbindung bestimmt werden. Dabei werden 4→8 verknüpfte Proanthocyanidine schneller gespalten als die 4→6 verknüpften (HEMINGWAY et al., 1982).

In **Tabelle 12** sind beispielhaft die bei der Phloroglucinolyse des trimeren Procyanidins C1 (-)-Epicatechin-4β→8-(-)-Epicatechin-4β→8-(-)-Epicatechin entstandenen Spaltprodukte aufgeführt (siehe auch Kap. 2.8.5).

**Tabelle 12:** Spaltprodukte der Phloroglucinolyse am Beispiel des trimeren Procyanidins C1

Spaltprodukt	t <sub>R</sub> [min]	m/z [M-H] <sup>-</sup>
(-)-Epicatechin-(4β→2)-Phloroglucinol	20,9	413
Dimeres Procyanidin B2-Phloroglucinol	20,9	701
Dimeres Procyanidin B2	33,8	577
(-)-Epicatechin	36,5	289

Führt man die Phloroglucinolyse unter milden Bedingungen durch (5 min Reaktionszeit bei 30°C), so entstehen aus den oberen Einheiten des trimeren Procyanidins C1 ein monomeres Phloroglucinol-Addukt (EC-Ph) und ein dimeres Phloroglucinol-Addukt (B2-Ph). Aus den unteren Einheiten entsteht bei der Degradation das dimere Procyanidin B2 sowie das Monomer (-)-Epicatechin.

Auf diese Weise können mit Hilfe der säurekatalytischen Degradation wertvolle Informationen über Bausteine und interflavanoide Bindungen gewonnen werden.

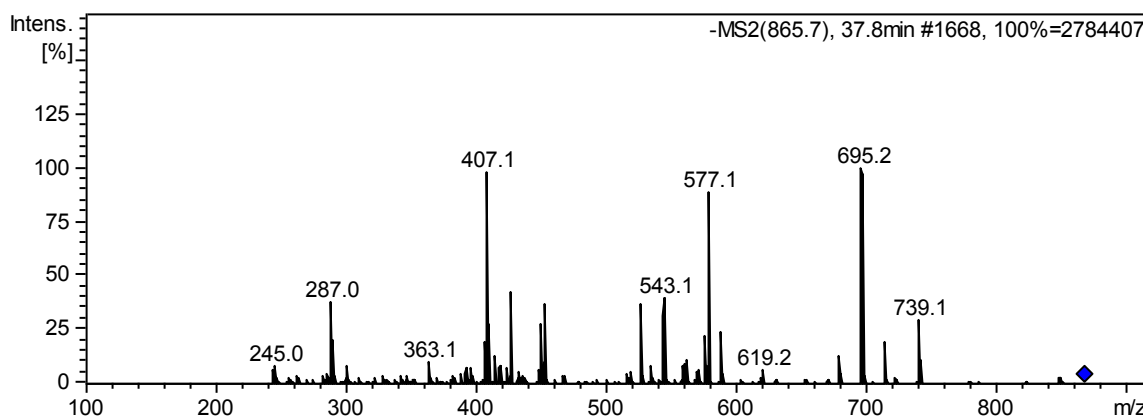
Zur abschließenden Strukturaufklärung wurden ein- und zweidimensionale  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren aufgenommen. Da Methanol- $\text{d}_4$  aufgrund seiner Eigenschaft zur Epimerisierung von Procyanidinen als Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie von Proanthocyanidinen nicht geeignet war, wurden alle Proanthocyanidine in Aceton- $\text{d}_6$  gemessen. Wie die Messungen bei Raumtemperatur zeigten, traten aufgrund der eingeschränkten Rotation um die Interflavanoidbindung starke Signalverbreiterungen auf, sodass ein Auswerten der Spektren nicht möglich war. Mit der Durchführung der NMR-Messungen bei Tieftemperatur (240 K) konnten hingegen sehr gute Spektren aufgenommen werden, da die Rotation durch das „Einfrieren“ der interflavanoiden Bindungen weitestgehend unterbunden werden konnte.

### 3.4.5.1 Isolierung von trimeren Procyanidinen

#### 3.4.5.1.1 Isolierung und Strukturaufklärung des trimeren Procyanidins (-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin (C1)

Aus Fraktion 1.7 der „Silb CCC-3“ konnten etwa 11 mg eines weissen amorphen Pulvers isoliert werden, das anhand der ESI- $\text{MS}^n$ -Daten als trimeres Proanthocyanidin identifiziert werden konnte.

**Abbildung 82** zeigt das Fragmentierungsmuster des isolierten Procyanidins, das typisch für ein trimeres Procyanidin ist. Anhand des Fragmentierungsmusters und des Moleküllions konnte lediglich die Art des Procyanidins bestimmt werden, jedoch nichts über die Art der Interflavanoidbindung oder die Stereochemie ausgesagt werden.

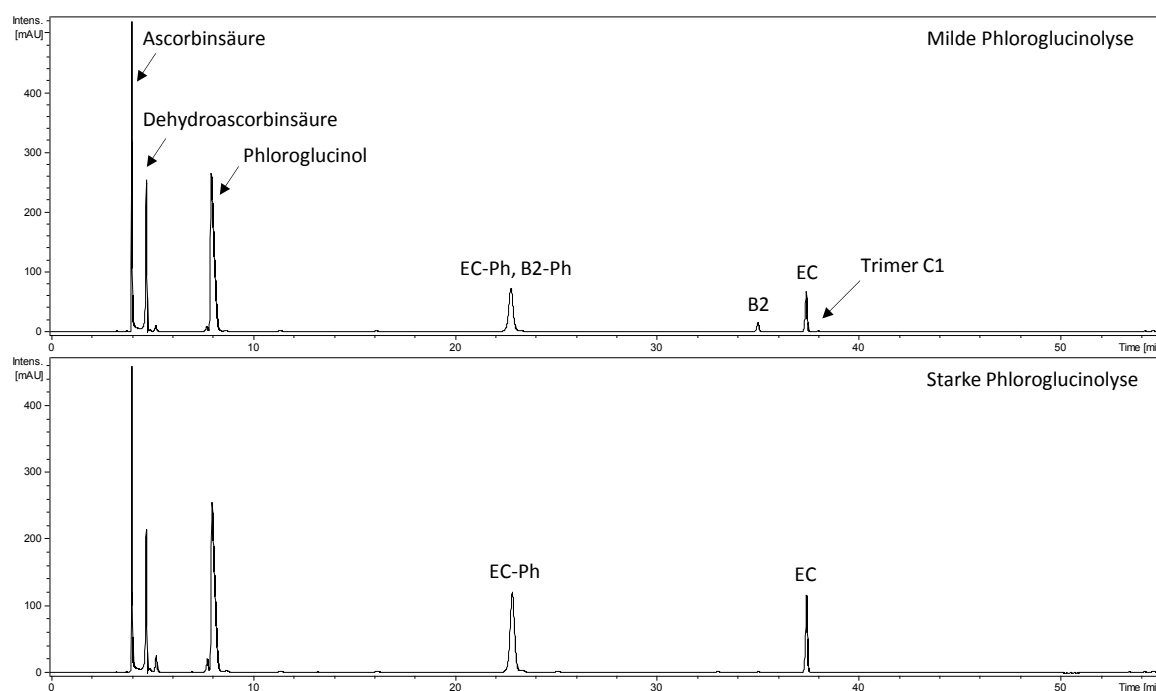


**Abbildung 82:**  $\text{MS}^2$ -Spektrum des trimeren Procyanidins C1 im negativen Modus

Eine erste Aussage über die einzelnen Bausteine des Procyanidins konnte durch die Durchführung einer säurekatalysierten Degradation (Phloroglucinolyse) getroffen werden. Es ist bekannt, dass sich dabei die Stereochemie der einzelnen Bausteine nicht verändert und anhand der unterschiedlichen

Spaltgeschwindigkeiten die Art der Interflavanoidbindung bestimmt werden kann (ESATBEYOGLU, 2011).

Die Phloroglucinolyse der isolierten Verbindung zeigte unter milden Bedingungen bei 30°C für 5 min im UV-Chromatogramm bei 280 nm einen nahezu vollständigen Abbau des Trimers, das bei 37,9 min eluierte. Anstelle des Trimers sind nach dem Abbau bei 22,8 min die Phloroglucinolprodukte EC-Ph und B2-Ph (66,1 %) sowie das dimere Proanthocyanidin B2 (7,7 %) bei 35,0 min zu erkennen. Das Monomer (-)-Epicatechin (26,2 %) eluierte bei 37,3 min und gab einen Hinweis darauf, dass das terminale Ende der isolierten Verbindung aus einer (-)-Epicatechin-Einheit bestand. Der schnelle und nahezu vollständige Abbau des Trimers sowie das Vorhandensein des B2-Ph als auch des B2 deuteten darauf hin, dass das vorliegende Trimer nur mit 4→8 Bindungen verknüpft war und außerdem nur aus (-)-Epicatechin-Einheiten zusammengesetzt sein konnte. In **Abbildung 83** sind die HPLC-Chromatogramme der milden und starken Phloroglucinolyse bei 280 nm dargestellt. Anhand der Ergebnisse der Phloroglucinolyse als auch der ESI-MS<sup>n</sup>-Analyse wurde von dem trimeren Procyanidin (-)-Epicatechin-4β→8-(-)-Epicatechin-4β→8-(-)-Epicatechin ausgegangen. Eine endgültige Absicherung der Struktur erfolgte mittels ein- und zweidimensionaler <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie.



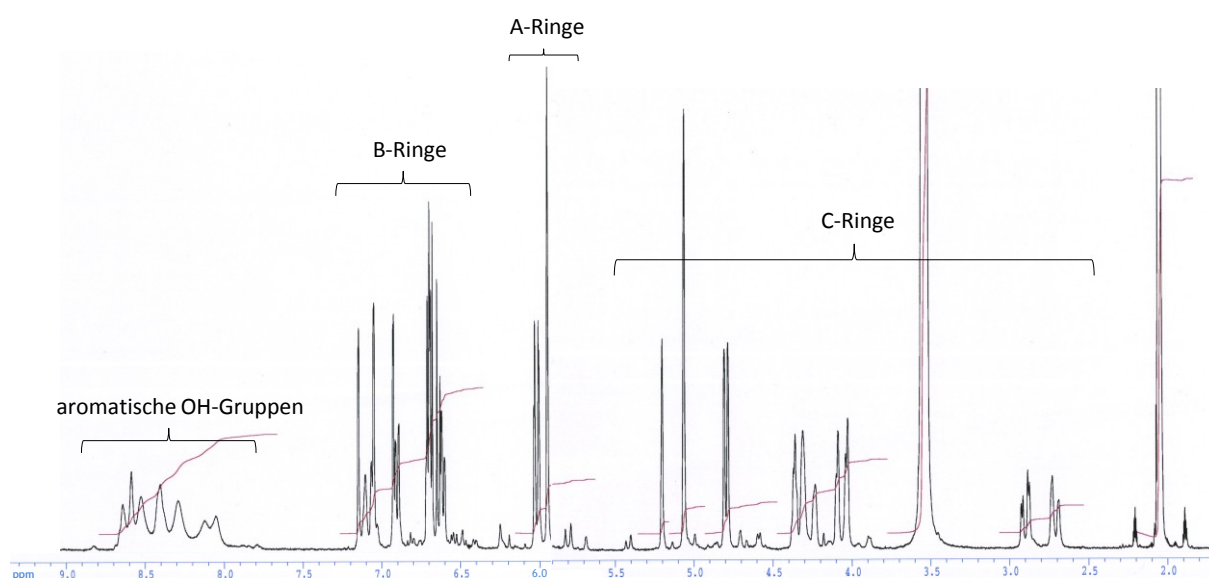
**Abbildung 83:** HPLC-Chromatogramme nach der milden und starken Phloroglucinolyse des Trimers C1 bei 280 nm

Bislang waren <sup>1</sup>H-NMR-Messungen von Procyanidinen meist nur nach deren Derivatisierung zu Peracetaten möglich, da es durch die eingeschränkte Rotation um die Interflavanoidbindung zu starken Verbreiterungen der Signale kam, welche nicht aussagekräftig waren. Vor kurzem konnte die Signalaufspaltung und -schärfe erheblich durch die Messung bei Tieftemperatur (240K statt 300K) verbessert werden (ESATBEYOGLU, 2011). Angelehnt daran, wurden die <sup>1</sup>H-NMR-Messungen der isolierten Proanthocyanidine in Aceton-d<sub>6</sub> ebenfalls bei Tieftemperatur gemessen, wodurch es zum „Einfrieren“ der interflavanoiden Bindung und damit zur Verbesserung der Signale kam.

In Kombination mit den zweidimensionalen COSY-, TOCSY- und ROESY-Spektren konnten alle Protonen eindeutig zugeordnet werden. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Trimers C1 wurde dabei in verschiedene Abschnitte unterteilt:

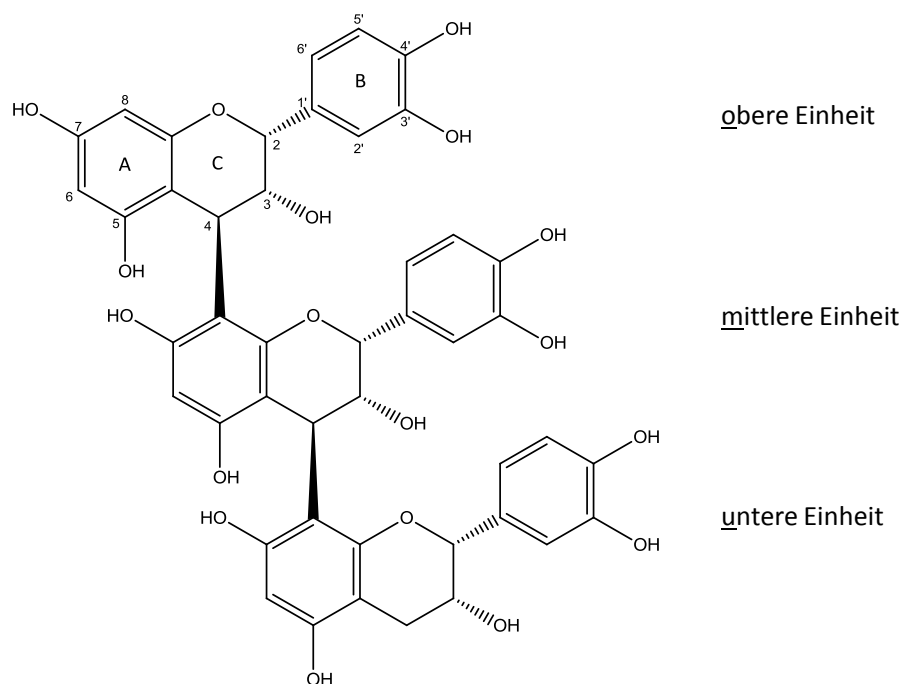
- 2,7-2,9 ppm	<u>C-Ring Protonen</u>
4,0-5,2 ppm	Protonen der heterozyklischen Ringe: H2, H3 und H4 sowie die 2 geminalen Protonen H4A und H4B der unteren Einheit
- 5,9-6,0 ppm	<u>A-Ring Protonen</u>
	aromatische metakoppelnde Protonen H6 und H8 der oberen Einheit sowie H6 der mittleren und unteren Einheit
- 6,6-7,2 ppm	<u>B-Ring Protonen</u>
	aromatische Protonen H2', H5' und H6' der oberen, mittleren und unteren Einheit
- 4,27-4,30 ppm	<u>Hydroxylgruppen</u>
7,1-7,2 ppm	aliphatische und aromatische Hydroxylgruppen
8,1-8,8 ppm	

Aufgrund der tiefen Temperatur sind die Signale der Hydroxylgruppen zum Tieffeld hin verschoben. Dabei entspricht eine Hydroxylgruppe der halben Integrationshöhe eines Protons. ESATBEYOGLU (2011) konnte anhand eines zusätzlichen H/D-Austausches mit Methanol- $\text{d}_4$  alle Hydroxylgruppen eindeutig zuordnen. Aufgrund der Übereinstimmung der NMR-Daten mit den Daten aus ESATBEYOGLU (2011) konnten die Signale hier ebenfalls den Hydroxylgruppen entsprechend zugeordnet werden.



**Abbildung 84:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des isolierten Trimers C1 bei 240 K (400 MHz, Aceton- $\text{d}_6$ )





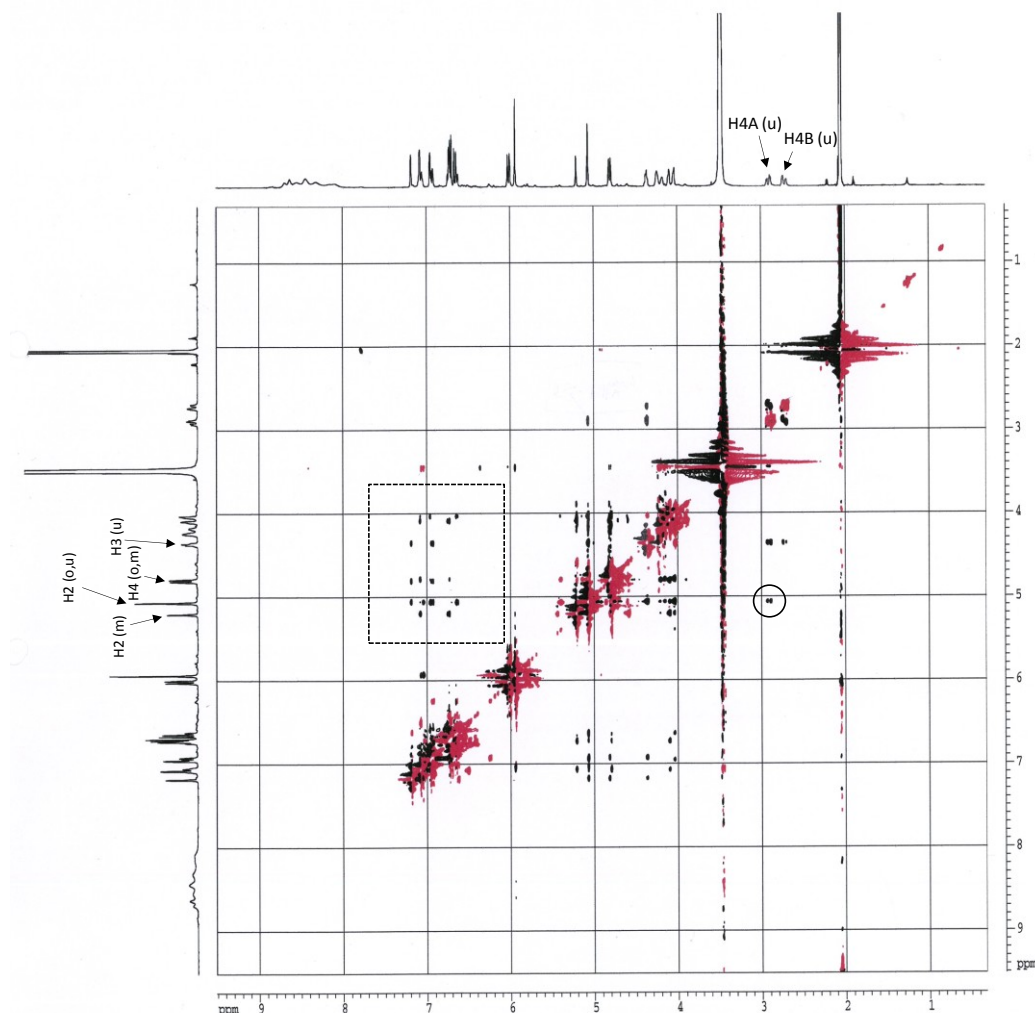
**Abbildung 85:** Strukturformel des trimeren Procyanidins C1

Die aromatischen metakoppelnden A-Ring Protonen H6 und H8 der oberen Einheit konnten anhand ihrer charakteristischen chemischen Verschiebung ( $\delta$  6,0 ppm) und ihrer typischen Kopplungskonstante von  $J = 1,9$  Hz eindeutig zugeordnet werden. Die H6 Protonen der mittleren sowie unteren Einheit erschienen als Singulett bei 5,94 ppm und wiesen, wie zu erwarten war, die gleiche Integrationshöhe auf wie die H6 und H8 Protonen der oberen Einheit. Dies lieferte einen Beweis dafür, dass das vorliegende Molekül aus drei Flavanol-Einheiten zusammengesetzt war.

Mit Hilfe der COSY- und TOCSY-Spektren konnten alle aromatischen Protonen H2', H5' und H6' des B-Ringes zugeordnet werden. Aufgrund der Nachbarschaft der Protonen H5' und H6' konnte eine große Kopplungskonstante von etwa 8 Hz ermittelt werden sowie eine kleine Kopplungskonstante von etwa  $J = 2$  Hz für die Kopplung des metaständigen H6' zum H2'. Weitere long-range Aufnahmen zeigten im COSY-Spektrum Korrelationen zwischen dem H2' sowie dem H6' Proton des B-Ringes mit dem H2 Proton des aliphatischen C-Ringes. Damit konnte die Stellung des B-Ringes zum aliphatischen C-Ring bestätigt und alle Signale eindeutig zugeordnet werden.

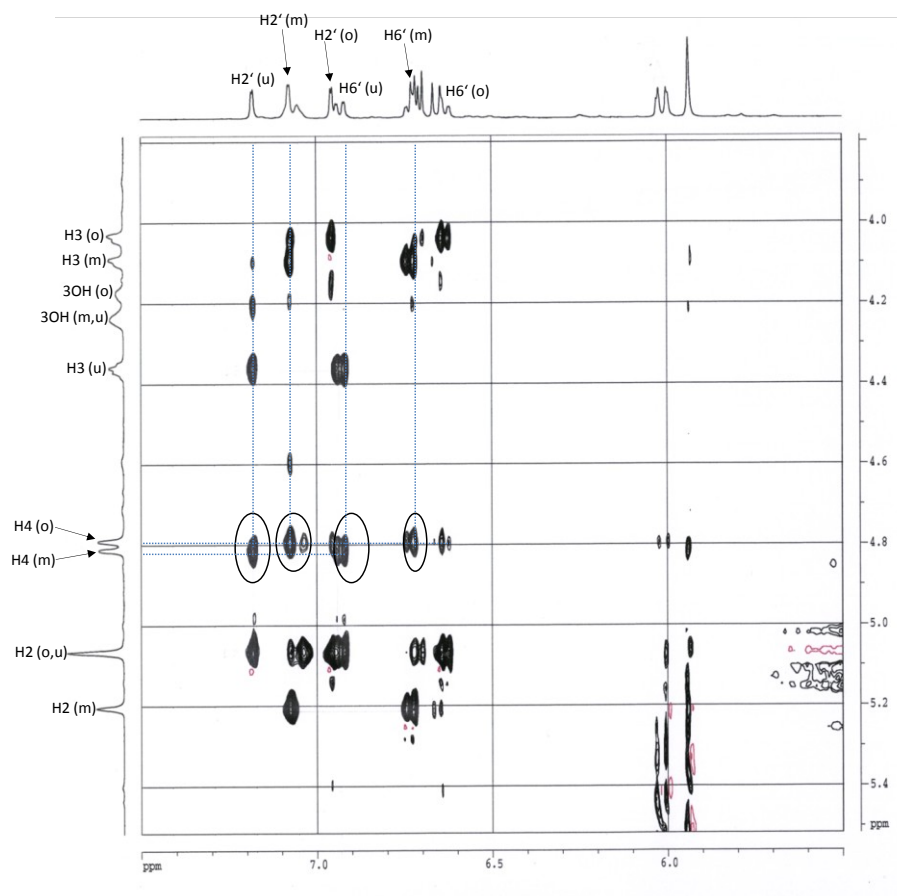
Die H2 Protonen bildeten 2 breite Singuletts bei  $\delta$  5,1 und 5,2 ppm, welche die cis Konfiguration der H2 und H3 Protonen zueinander bestätigten. Durch die Aufspaltung der H2 Protonen in breite Singuletts konnte auf das Monomer (-)-Epicatechin in allen Einheiten des Moleküls geschlossen werden, da bei Anwesenheit des 2,3 trans konfigurierten Catechins Aufspaltungen mit großen Kopplungskonstanten zu sehen gewesen wären. Neben den Multipletts der H3 Protonen zwischen  $\delta$  4,0 und 4,4 ppm, die später mit Hilfe der COSY-Spektren eindeutig zugeordnet werden konnten, waren bei 2,90 ppm und 2,71 ppm die Aufspaltungsmuster der beiden geminalen H4 Protonen der unteren Einheit zu erkennen. Beide Protonen spalteten jeweils in ein Dublett von Dublett auf (dd,  $\delta$  2,71 ppm,  $J = < 1$  Hz, 16,4 Hz, H4B; dd,  $\delta$  2,90 ppm,  $J = 4,3$  Hz, 16,4 Hz, H4A). Mit Hilfe des ROESY-Spektrums konnte anhand der chiralen C4-Position die Stereochemie bestimmt werden. Während bei der oberen und mittleren

Einheit keine Wechselwirkung zwischen den H2 und H4 Protonen festgestellt wurde, konnte diese Korrelation bei der unteren Einheit beobachtet werden (siehe **Abbildung 86**). Im ROESY- Spektrum war demnach eindeutig zu erkennen, dass das H2 Proton der unteren Einheit mit dem H4A Proton, also dem axial-ständigen H4 Proton, korrelierte.



**Abbildung 86:** ROESY-Spektrum des isolierten Trimers C1 bei 240 K (400 MHz, Aceton- $d_6$ )

Weiterhin gab das ROESY-Spektrum Aufschluss über die Art der interflavanoiden Bindungen. Durch die über den Raum koppelnden Protonen H2' und H6' der unteren Einheit mit dem Proton H4 der mittleren Einheit und ebenso der H2' und H6' Protonen der mittleren Einheit mit dem H4 Proton der oberen Einheit konnten die 4→8 Verknüpfungen zwischen den Einheiten bestätigt werden. (**Abbildung 87**).



**Abbildung 87:** Ausschnitt aus dem ROESY-Spektrum des isolierten Trimers C1 bei 240 K (400 MHz, Aceton- $d_6$ )

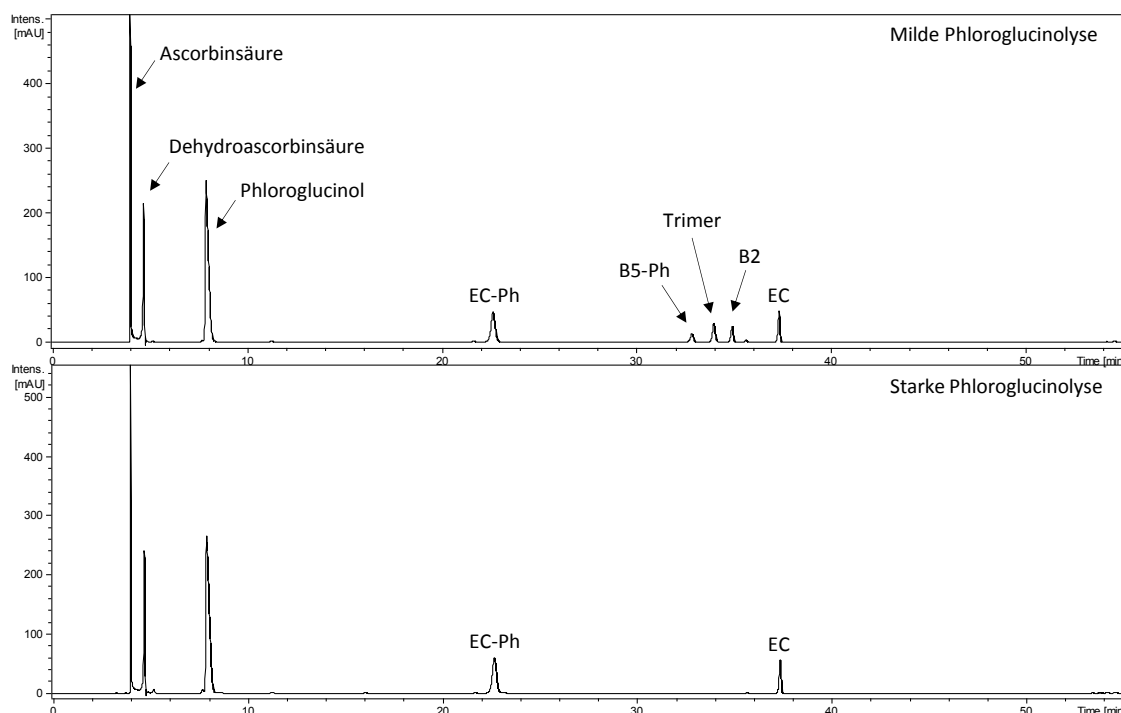
Weiterhin waren in dem Ausschnitt des ROESY-Spektrums die Korrelationen zwischen den Protonen H2' zu H2 sowie H2' zu H3 aller Einheiten zu sehen, was nochmals die Stellung des B-Ringes zum C-Ring bestätigte.

Das Auftreten vieler kleiner Signale innerhalb der  $^1\text{H}$ -Spektren ist nicht durch Verunreinigungen hervorgerufen worden, sondern hängt mit Signalverdopplungen zusammen. Nach ESATBEYOGLU (2011) treten solche Signalverdopplungen aufgrund mehrerer möglicher Konformere auf, die durch die Rotation um jede Interflavanoidbindung zu Stande kommen. Somit kann es zu einem Hauptkonformer und zwei Minorkonformeren kommen, die die Vielzahl der kleinen Signale in den Spektren erklären.

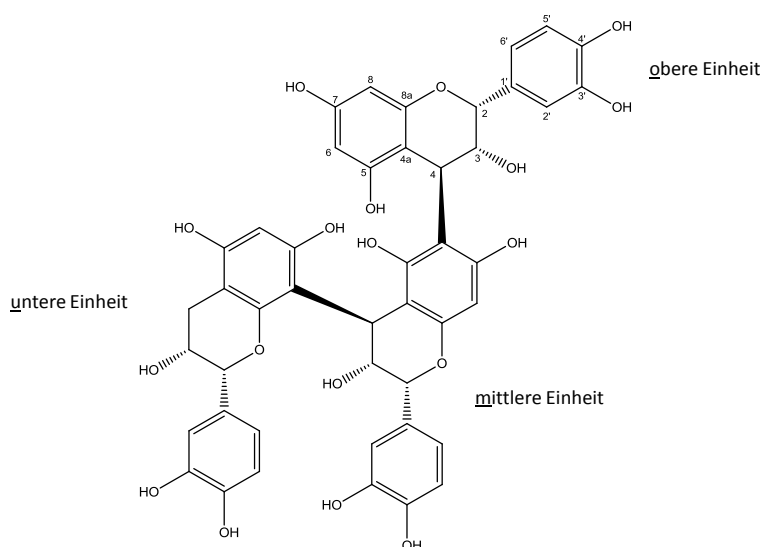
#### 3.4.5.1.2 Isolierung und Strukturaufklärung des trimeren Procyanidins (-)-Epicatechin-4 $\beta$ →6-(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin

Aus Fraktion 1.6 der „Silb CCC-3“ konnten 5 mg eines weissen amorphen Pulvers isoliert werden. Die ESI- $\text{MS}^n$ -Daten wiesen ebenfalls auf ein trimeres Procyanidin hin (siehe Fragmentierungsmuster **Abbildung 82**). Eine säurekatalysierte Degradation der isolierten Verbindung unter milden Bedingungen ergab 41,7 % EC-Ph sowie 9,3 % B5-Ph, die aus den oberen Einheiten des Trimers entstanden sind. Für die unteren Einheiten entstanden 12,4 % dimeres Procyanidin B2 und 19,1 % (-)-Epicatechin. Das Trimer selbst ist nur zu 82,5 % gespalten worden. Der hohe Anteil des nicht gespaltenen Trimers von 17,5 % und das Spaltprodukt B5-Ph deuteten auf eine 4→6 Verknüpfung zwischen der oberen und mittleren Einheit hin. Die Anwesenheit des Dimers B2 belegte eine weitere 4→8 Verknüpfung zwischen der mittleren und der unteren Einheit des Moleküls.

Die Chromatogramme nach der milden und starken Phloroglucinolyse sind in **Abbildung 88** dargestellt. Aus den Ergebnissen der Phloroglucinolyse ging hervor, dass es sich wahrscheinlich um das Trimer (-)-Epicatechin-4 $\beta$ →6-(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin handelte.



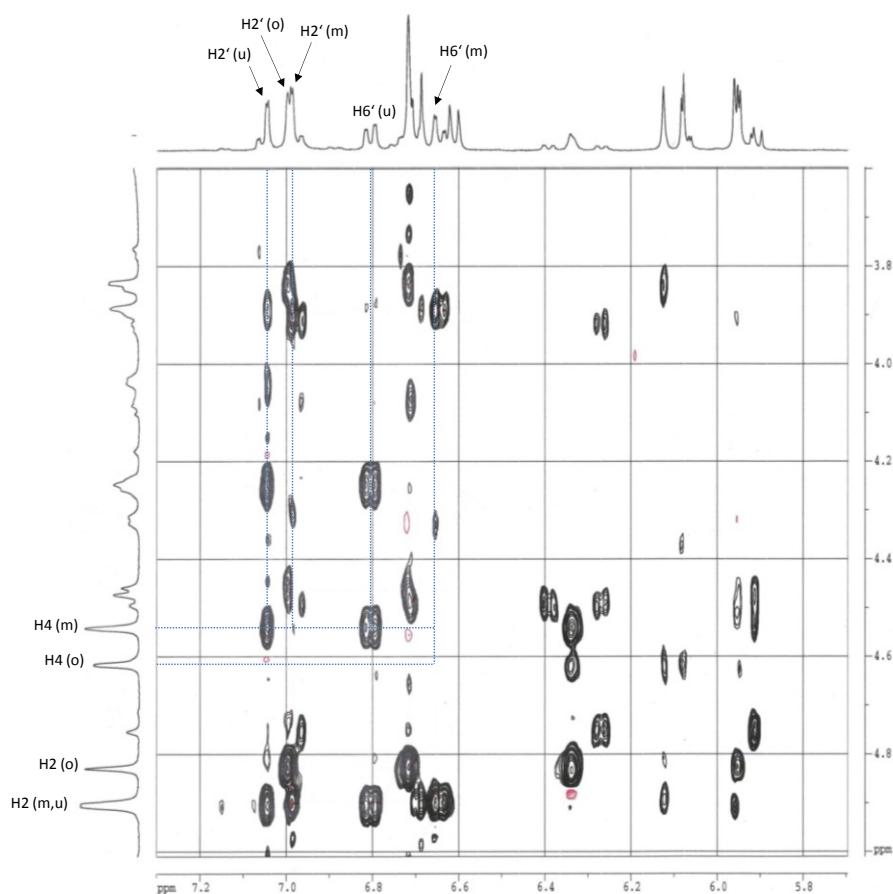
**Abbildung 88:** HPLC-Chromatogramme nach der milden und starken Phloroglucinolyse des Trimers (-)-EC-4→6-(-)-EC-4→8-(-)-EC bei 280 nm



**Abbildung 89:** Strukturformel des trimeren Procyanidins (-)-Epicatechin-4 $\beta$ →6-(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin

Die ein- und zweidimensionalen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Verbindung bestätigten diese Annahme. Während im ROESY-Spektrum Kopplungen zwischen den Protonen H2' und H6' der unteren Einheit zum H4 Proton der mittleren Einheit zu sehen waren, waren keine Korrelationen zwischen den H2' und H6' Protonen der mittleren Einheit mit dem H4 Proton der oberen Einheit vorhanden (**Abbildung 90**). Damit war bewiesen, dass die oberen Einheiten nicht 4→8 miteinander verknüpft sein konnten, sondern wie bereits aus der säurekatalytischen Degradation hervorging, eine 4→6 Verknüpfung vorlag.

Aufgrund der NOE-Wechselwirkung der H2' und H6' Protonen der unteren Einheit mit dem H4 der mittleren Einheit konnte bestätigt werden, dass die mittlere und untere Einheit des Moleküls 4→8 miteinander verknüpft waren.



**Abbildung 90:** Ausschnitt aus dem ROESY-Spektrum des isolierten Trimers (-)-EC-4→6-(-)-EC-4→8-(-)-EC bei 240 K (400 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>)

#### 3.4.5.1.3 Isolierung und Strukturaufklärung des trimeren Procyanidins (-)-Epicatechin-4β→8-(-)-Epicatechin-4β→6-(-)-Epicatechin

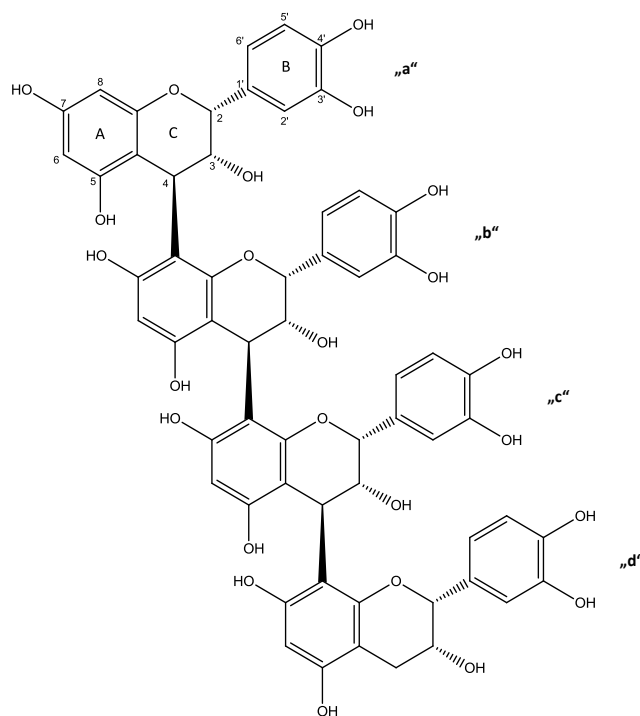
Ein weiteres trimeres Procyanidin konnte als weisses Pulver aus Fraktion 1.9 der „Silb CCC-3“ isoliert werden. Die Ergebnisse der milden Phloroglucinolyse ergaben 47,2 % EC-Ph und B2-Ph, 27,1 % Dimer B5, 14,9 % EC und 10,8 % nicht gespaltenes Trimer. Die Anwesenheit des Dimers B5 als auch das zu 10,8 % nicht gesplante Trimer deuteten darauf hin, dass es sich bei den unteren Einheiten des Trimers um zwei (-)-Epicatechin-Einheiten handelte, die 4→6 miteinander verknüpft waren. Für die oberen Einheiten des Moleküls sind EC-Ph und B2-Ph entstanden, was für eine 4→8 Verknüpfung der oberen (-)-Epicatechin-Einheiten spricht.

Aufgrund der geringen Ausbeute von nur 2 mg der Verbindung konnte die Struktur nicht mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie abgesichert werden.

### 3.4.5.2 Isolierung und Strukturaufklärung eines tetrameren Proanthocyanidins (-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin

Aus Fraktion 1.5 der „Silb CCC-3“ konnten 12 mg eines weissen amorphen Pulvers isoliert werden. Die LC-ESI-MS-Analyse ergab ein Pseudomolekülion von  $m/z$  1155  $[M+H]^+$  sowie die Fragmentionen  $m/z$  867 und  $m/z$  579 und ein Natriumaddukt bei  $m/z$  1177. Anhand der Daten wurde vermutet, dass es sich bei der vorliegenden Verbindung um ein tetrameres Procyanidin handelt. Auch mit der berechneten theoretischen Molekülmasse eines tetrameren Procyanidins von 1154 g/mol stimmt die Molekülionenmasse überein, sodass es keinen Zweifel daran gab, dass es sich hierbei um ein tetrameres Procyanidin handelte und kein dimeres Artefakt vorlag.

Die milde Phloroglucinolyse lieferte 74,0 % EC-Ph und B2-Ph, 7,2 % Dimer B2, 0,5 % Trimer C1 und 18,8 % EC. Alle entstandenen Spaltprodukte wiesen eine 4→8 Verknüpfung auf, sodass davon auszugehen war, dass es sich bei der isolierten Verbindung um ein aus vier (-)-Epicatechin-Einheiten und in allen Einheiten 4→8 verknüpftes Tetramer handelte.



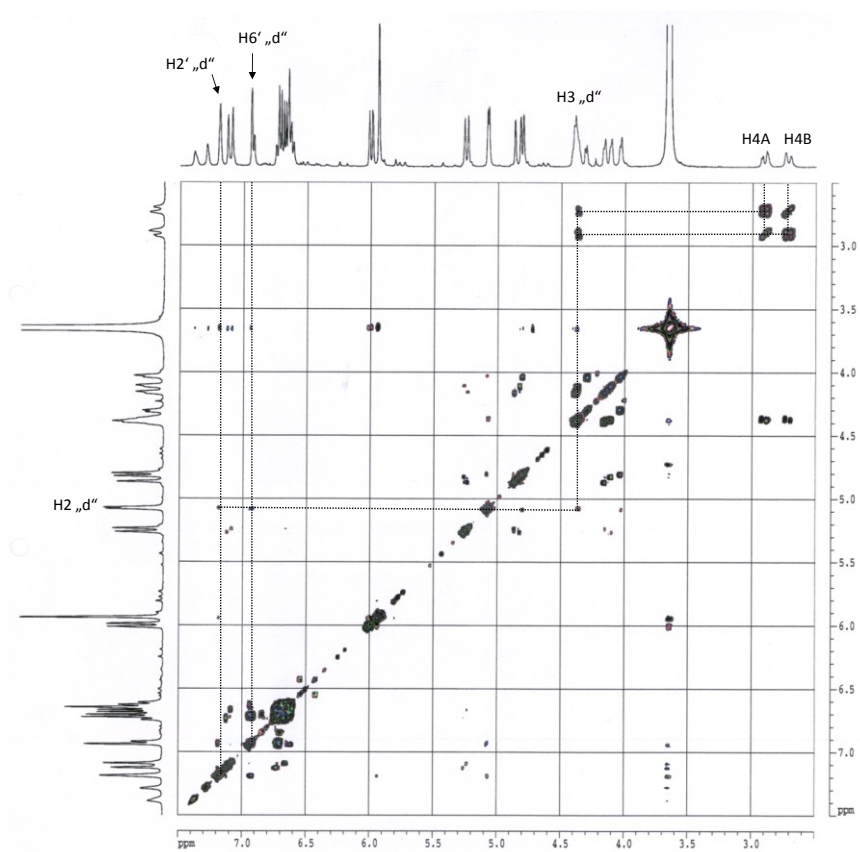
**Abbildung 91:** Strukturformel des tetrameren Procyanidins (-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin

Anhand des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums war im Bereich der A-Ring Protonen bei einer chemischen Verschiebung von etwa 6,0 ppm bereits anhand der Integrationshöhen zu erkennen, dass es sich bei dem isolierten Proanthocyanidin tatsächlich um ein Tetramer handeln musste, da die Protonen H6 und H8 der obersten Einheit „a“ zu den übrigen H6 Protonen der unteren Einheiten im Verhältnis 2:3 auftraten, womit bestätigt wurde, dass 3 weitere Flavanol-Einheiten des Moleküls jeweils ein H6 Proton tragen mussten. Ausgehend von den beiden geminalen Protonen H4A und H4B der untersten Einheit „d“ konnten anhand der Korrelationen innerhalb des COSY-Spektrums schnell alle C- und B-Ring Protonen dieser Einheit zugeordnet werden (siehe **Abbildung 92**).

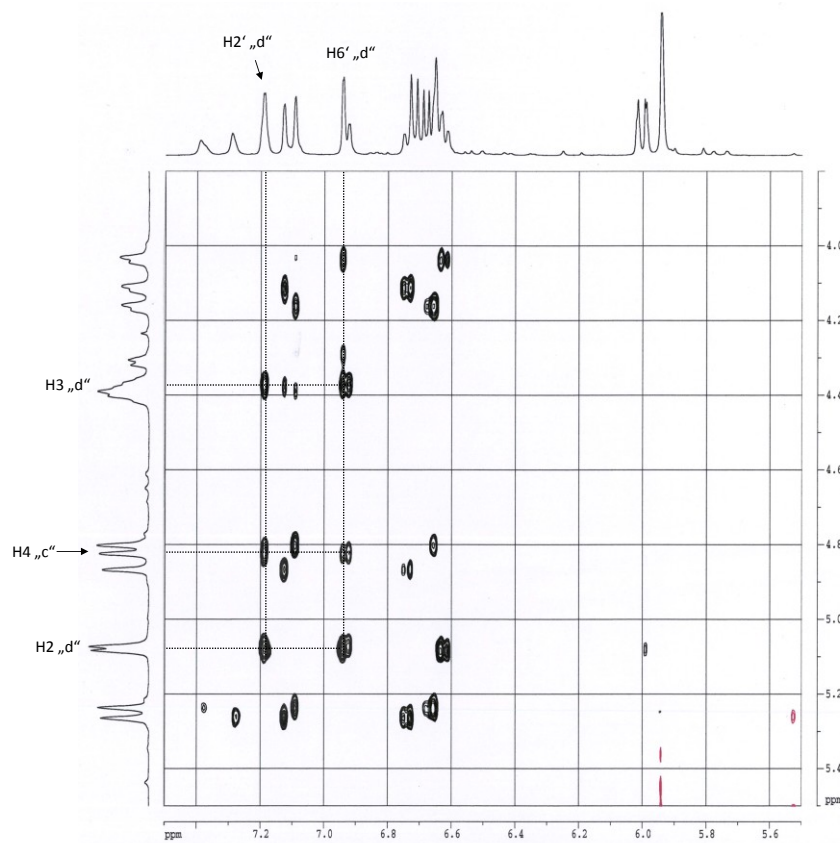
Anhand der NOE Wechselwirkungen der H2' und H6' Protonen mit den H2 und H3 Protonen konnten in Kombination mit dem COSY-Spektrum alle weiteren Protonen der B- und C-Ringe eindeutig

zugeordnet werden. Weiterhin erlaubten die NOE Wechselwirkungen der H2' und H6' Protonen jeweils mit dem H4 Proton der nächst höheren Einheit einen Beweis für alle 4→8 Verknüpfungen innerhalb des Moleküls.

So sind in **Abbildung 93** die entscheidenden Korrelationen am Beispiel der untersten Einheit dargestellt sowie auch die NOE Wechselwirkung der H2' und H6' Protonen mit dem H4 der nächst höheren Einheit „c“. Identisch wurde mit den übrigen Einheiten des Moleküls verfahren, sodass am Ende auch die oberste Einheit „a“ aufgrund der fehlenden NOE Wechselwirkung zu einem H4 Proton eindeutig zugeordnet werden konnte.



**Abbildung 92:** COSY-Spektrum des isolierten tetrameren Procyanidins bei 240 K (400 MHz, Aceton d<sub>6</sub>)

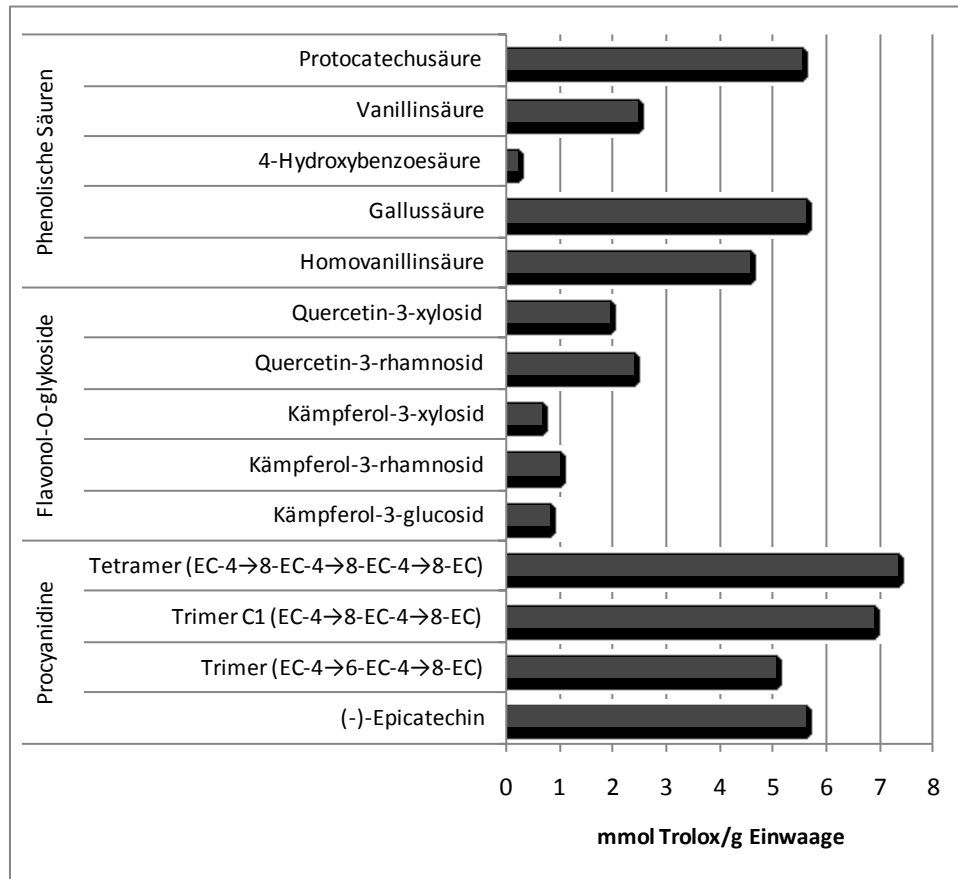


**Abbildung 93:** Ausschnitt aus dem ROESY-Spektrum des isolierten tetrameren Procyanidins bei 240 K (400 MHz, Aceton d<sub>6</sub>)

### 3.4.6 Antioxidative Aktivitäten von Inhaltsstoffen aus Silberlindenblüten

Alle aus den Silberlindenblüten isolierten phenolischen Säuren, Flavonol-O-glykoside sowie Procyanidine wurden mittels TEAC-Assay auf ihre antioxidative Wirksamkeit untersucht. **Abbildung 94** gibt alle ermittelten antioxidativen Aktivitäten wieder.





**Abbildung 94:** Antioxidative Aktivitäten der isolierten Verbindungen aus Silberlindenblüten [mmol Trolox/g Einwaage]

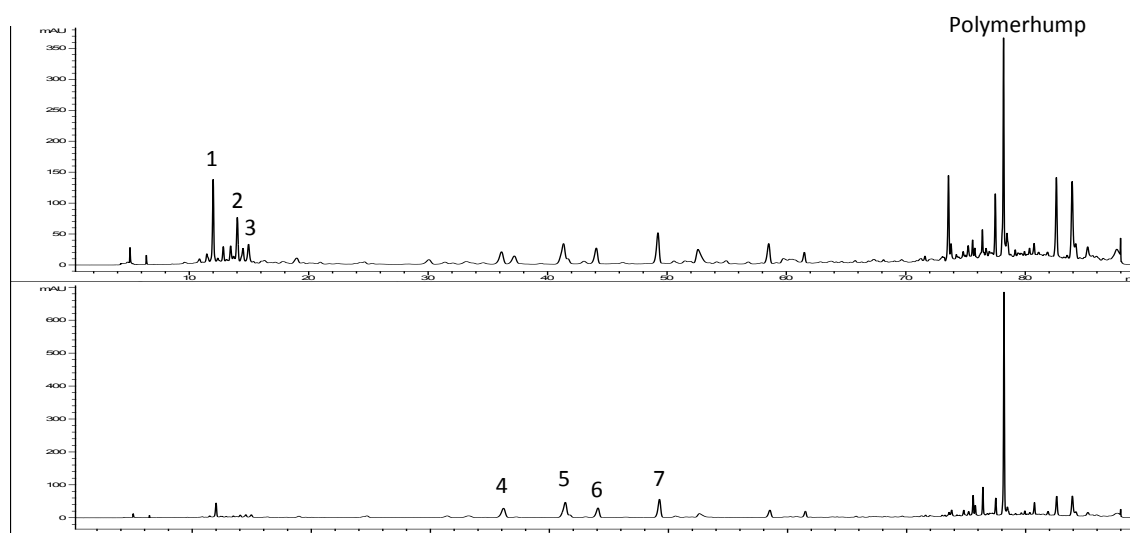
Aus der Abbildung geht eindeutig hervor, dass es sich bei den isolierten Procyanidinen um die antioxidativ wirksamsten Verbindungen in Silberlindenblüten handelte. RICE-EVANS et al. (1996) führten die antioxidative Aktivität unter anderem auf die Anzahl und Position der Hydroxylgruppen einer Verbindung zurück. Daneben schrieben sie auch der o-dihydroxy „catechol“-Struktur am B-Ring eine bedeutende Rolle zu. Beide Strukturmerkmale können anhand der Vielzahl der frei vorliegenden Hydroxygruppen sowohl am A-Ring als auch am B-Ring innerhalb eines Procyanidinmoleküls bestätigt werden und erklären die damit verbundene hohe antioxidative Wirksamkeit, die bereits mehrfach diskutiert wurde (WIESE, 2010; MUSELIK et al., 2007). Daten zur antioxidativen Wirksamkeit von Procyanidinen gibt es bislang nur sehr wenig, da Procyanidine auf kommerziellem Weg nicht erworben werden können und somit selbstständig isoliert oder synthetisiert werden müssen. Auch ein großer Teil der isolierten phenolischen Säuren zeigte eine hohe antioxidative Wirksamkeit gegenüber dem Vitamin E Derivat Trolox. Demnach tragen diese ebenfalls erheblich zum antioxidativen Potential der Silberlindenblüten bei. Geringere antioxidative Aktivitäten wiesen die isolierten Flavonol-O-glykoside auf. Während die freien Aglykone Quercetin und Kämpferol im Vergleich hohe antioxidative Kapazitäten zeigten (**Abbildung 56**), nimmt die antioxidative Aktivität mit der Zahl an verknüpften Zuckerbausteinen erheblich ab. Allgemein besitzen Quercetin-Derivate höhere antioxidative Wirksamkeiten als vergleichbare Kämpferol-Derivate. Auch diese Tatsache kann anhand der unterschiedlichen Zahl an Hydroxygruppen erklärt werden, da der B-Ring des Quercetins 2-fach hydroxyliert ist, während Kämpferol nur eine Hydroxygruppe am B-Ring trägt.

### 3.5 Hopfendolden

#### 3.5.1 Polyphenolprofil

In der Literatur wird beschrieben, dass die Vor- und Deckblätter der Hopfenzapfen reich an phenolischen und polyphenolischen Verbindungen sind (DE KEUKELEIRE et al., 1999). Der Gesamtpolyphenolgehalt von Hopfenzapfen beträgt etwa 3-6 %. Nach MCMURROUGH et al. (1982) sowie SÄGESSER und DEINZER (1996) handelt es sich bei den bislang isolierten Verbindungen um Glykoside von Quercetin und Kämpferol, wobei die Rutinoside und Glykoside die Hauptverbindungen darstellen. Von SEGAWA et. al. (2006) wurden weiterhin die Flavonol-O-glykoside Quercetin-3-O-rutinosid (Rutin), Quercetin-3-O-glucosid (Isoquercitrin), Quercetin-3-O-malonylglucosid (Isoquercitrin-malonat), Kämpferol-3-O-malonylglucosid (Astragalin-malonat), Kämpferol-rutinosid und Kämpferol-3-O-glucosid (Astragalin) identifiziert.

In **Abbildung 95** sind HPLC-DAD Chromatogramme bei 324 nm (oben) und 354 nm (unten).



**Abbildung 95:** HPLC Chromatogramme eines methanolischen Hopfenextraktes bei 324 nm (oben) und 354 nm (unten), Peak-Nr. siehe **Tabelle 13**

Im Vergleich zu den bisher beschriebenen Naturstoffen Holunderblüten und Silberlindenblüten ist bereits in den Chromatogrammen eines methanolischen Hopfenextraktes zu sehen, dass dieser nur geringe Flavonoidgehalte aufweist. Das Chromatogramm bei 324 nm zeigt die drei Hydroxyzimtsäurederivate 3-Kaffeoylchinasäure (1), 3-p-Cumaroylchinasäure (2) sowie 3-Feruloylchinasäure (3). Bei 354 nm sind außerdem noch geringe Intensitäten einiger Flavonol-O-glykoside zu sehen, die anhand der LC-MS-Analyse als Kämpferol- und Quercetinglykoside identifiziert werden konnten (**Tabelle 13**).

### 3.5.2 Quantitative Bestimmungen

In **Tabelle 13** sind die ermittelten Gehalte der Hydroxyzimtsäurederivate und Flavonol-O-glykoside in den Hopfendolden angegeben.

**Tabelle 13:** Gehalte der Hydroxyzimtsäurederivate und Flavonol-O-glykoside in Hopfendolden in [mg/kg TS]

Peak	Verbindung	t <sub>R</sub> [min]	Gehalt [mg/kg TS] im methanolischen Extrakt	Gehalt [mg/kg TS] im wässr. Extrakt
1	3-Kaffeoylchinasäure	12,0	428	358
2	3-p-Cumaroylchinasäure	14,1	201	153
3	3-Feruloylchinasäure	15,0	26	0,04
4	Quercetin-glucosid/galactosid	36,4	351	189
5	Quercetin-malonyl-glucosid	41,6	729	575
6	Kämpferol-glucosid/galactosid	44,2	263	119
7	Kämpferol-malonyl-glucosid	49,4	615	488

Ersichtlich ist, dass die hier untersuchten Hopfendolden deutlich weniger Flavonoide enthalten als die bereits untersuchten Holunder- und Silberlindenblüten. Anhand dessen kann sowohl die im Vergleich niedrige antioxidative Aktivität als auch der niedrige Gesamtphenolgehalt erklärt werden (siehe auch **Abbildung 20 und 21**).

## 4 Zusammenfassung

Vielseitige Kräuter- und Früchtetees erfreuen sich mit einem Absatz von mehr als 30.000 Tonnen pro Jahr einer großen Beliebtheit bei der deutschen Bevölkerung. Im Volksmund besitzen sie ein positives Image als gesunde Getränke. Im Vergleich zu den meisten anderen Getränken sind sie nicht nur nahezu zucker- und kalorienfrei, sondern weisen darüber hinaus einen hohen Gehalt an Polyphenolen auf. Innerhalb der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, sowohl das Polyphenolprofil der drei Teeinhaltsstoffe Holunderblüten, Silberlindenblüten und Hopfendolden zu charakterisieren als auch die wichtigsten Flavonoide zu quantifizieren. Insbesondere war der hohe Flavonoidgehalt der Holunder- und Silberlindenblüten auffällig. Einige Flavonol-O-glykoside und Hydroxyzimtsäurederivate, wie Quercetin-3-rutinosid (20,7 g/kg TS), 5-Kaffeoylchinasäure (15,6 g/kg TS), di-Kaffeoylchinasäure (13,1 g/kg TS), Isorhamnetin-3-rutinosid (2,9 g/kg TS), Quercetin-glucosid bzw. galactosid (2,9 g/kg TS) und 3-Kaffeoylchinasäure (2,6 g/kg TS) wurden als Hauptverbindungen in Holunderblüten verifiziert. Neben einigen Flavonol-O-glykosiden wie Quercetin-3-rutinosid (631 mg/kg TS), Kämpferol-3-rutinosid (773 mg/kg TS) und Quercetin-3-rhamnosid (762 mg/kg TS) stellten verschiedene dimere und trimere Procyanidine, wie das Trimer C1 (EC-(4 $\beta$ →8)-EC-(4 $\beta$ →8)-EC) und das Dimer B2 (EC-(4 $\beta$ →8)-EC), mit jeweils 3,1 g/kg TS (angegeben als EC-Äquivalent), die mengenmäßig wichtigsten Flavonoide in Silberlindenblüten dar. Mit 729 mg/kg TS und 615 mg/kg TS sind Quercetin-malonyl-glucosid und Kämpferol-malonyl-glucosid Hauptverbindungen der untersuchten Hopfendolden.

Polyphenole sind trotz ihres geringen Gehaltes in pflanzlichen Lebensmitteln ein wesentlicher Bestandteil unserer täglichen Ernährung. In der Vergangenheit wurden Polyphenolen anhand verschiedener *in vitro*-Untersuchungen sowie epidemiologischer Studien gesundheitsfördernde Wirkungen zugesprochen. Grundvoraussetzung für diese Wirkungen ist eine systemische Verfügbarkeit dieser Stoffe und somit eine ausreichend hohe Konzentration im Plasma. Um die Bioverfügbarkeit der in Holunderblüten vorkommenden Flavonoide zu bestimmen, wurden an 12 Probanden innerhalb einer placebokontrollierten Humanstudie in Kooperation mit der Leibniz Universität Hannover ein Holunderblütenteeaufguss sowie eine aus Holunderblüten isolierte weniger komplexe antioxidative Fraktion im cross-over Design verabreicht. An drei Untersuchungstagen (Holunderblütenteeaufguss, Aufguss aus der isolierten Holunderblütenfraktion, Placebo) erfolgten Blutabnahmen vor der Verabreichung sowie 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 5 und 8 Stunden nach dem Konsum. Urinproben wurden ebenfalls vor dem Konsum sowie nach 2; 4; 6; 8 und in Form einer Sammelprobe nach 8-24 Stunden gesammelt. Der zu verabreichende Teeaufguss enthielt verschiedene Flavonol-O-glykoside wie Quercetin-3-rutinosid, Quercetin-3-galactosid/glucosid, Isorhamnetin-3-rutinosid sowie verschiedene Hydroxyzimtsäurederivate wie 5-Kaffeoylchinasäure oder di-Kaffeoylchinasäure. Die mittels HSCCC isolierte Fraktion, die innerhalb des TEAC-Tests das höchste antioxidative Potential aufwies, enthielt als Hauptinhaltsstoff das Flavonol-O-glykosid Rutin und darüberhinaus geringe Gehalte eines Isorhamnetinglykosids und des Hydroxyzimtsäurederivates

5-Kaffeoylchinasäure. Die gewonnenen Plasma- und Urinproben wurden mit Hilfe zuvor optimierter Methoden aufgearbeitet und schließlich mittels LC-ESI-MS-MS untersucht. Parallel dazu wurden die gewonnenen Plasmaproben auf ihre antioxidative Aktivität untersucht.

Trotz einheitlicher Ernährung der Probanden erschwerten hohe interindividuelle Schwankungen die Auswertung der Ergebnisse.

Nach Verabreichung des Holunderblütenteeaufgusses lag die systemische Verfügbarkeit der applizierten Quercetinglykoside bei 0 %. Quercetinsulfat ( $\emptyset c_{\max} = 0,14 \mu\text{mol/L}$ ) konnte als einziger bioverfügbarer Phase-II-Metabolit im Plasma nachgewiesen werden. Chinasäure ( $\emptyset c_{\max} = 16 \mu\text{mol/L}$ ), Homovanillinsäure ( $\emptyset c_{\max} = 42 \mu\text{mol/L}$ ), Dihydroferulasäure ( $\emptyset c_{\max} = 0,40 \mu\text{mol/L}$ ) und Ferulasäure ( $\emptyset c_{\max} = 0,09 \mu\text{mol/L}$ ) wurden vereinzelt im Plasma weniger Probanden identifiziert. Während Maximalkonzentrationen des Quercetinsulfates sowie der Chinasäure erst nach 8 h festgestellt werden konnten, waren die höchsten Konzentrationen an Homovanillinsäure, Dihydroferulasäure und Ferulasäure bereits nach 0,5 bzw. 1,5 h erreicht.

Nach Verabreichung der isolierten antioxidativen Fraktion, die weniger komplex zusammengesetzt war als der Teeaufguss, konnte einzig Chinasäure ( $\emptyset c_{\max} = 49 \mu\text{mol/L}$ ) als potentieller Metabolit im Plasma nachgewiesen werden. Ursache für die niedrige Ausbeute an Metaboliten nach Gabe der isolierten Fraktion ist vermutlich die geringe Löslichkeit der Fraktion in Wasser, was zu einer verminderten Bioverfügbarkeit der Flavonoide führt.

Wie aufgrund der niedrigen Plasmakonzentrationen zu erwarten war, konnte kein Anstieg des antioxidativen Potentials der Plasmaproben festgestellt werden. Eine einmalige Gabe der hier verwendeten Teeaufgüsse führte zu einer vernachlässigbar geringen Bioverfügbarkeit der verabreichten Substanzen. Vergleichbare Studien zeigten, dass mit einer langfristigen kontinuierlichen Verabreichung ähnlicher Prüfprodukte die Bioverfügbarkeit der zu erwartenden Metabolite erheblich gesteigert werden konnte.

Im Urin der Probanden konnten neben den Metaboliten wie Homovanillinsäure ( $\emptyset c_{\max} = 100 \mu\text{mol/L}$ ) oder Glucuroniden der Aglykone Kämpferol ( $\emptyset c_{\max} = 1,5 \mu\text{mol/L}$ ) und Quercetin ( $\emptyset c_{\max} = 4,3 \mu\text{mol/L}$ ) auch unveränderte Verbindungen wie 5-Kaffeoylchinasäure ( $\emptyset c_{\max} = 4,6 \mu\text{mol/L}$ ) nach Verabreichung des Teeaufgusses in erhöhter Konzentration festgestellt werden. Mit Ausnahme der Homovanillinsäure war keiner dieser Metabolite im Plasma nachweisbar, was eine systemische Verfügbarkeit dieser Stoffe wiederum fragwürdig macht.

Silberlindenblüten wiesen innerhalb dieser Arbeit eine signifikant erhöhte antioxidative Aktivität auf, sodass auf die wirksamen Inhaltsstoffe näher eingegangen wurde. Nach Fraktionierung eines Silberlindenblütenextraktes mittels HSCCC und Spiral-Coil LSRCCC konnte eine Reihe antioxidativ wirksamer Substanzen isoliert werden. Viele der isolierten Verbindungen wurden in der einschlägigen Literatur als Inhaltsstoffe von Silberlindenblüten bislang nicht beschrieben. So wurden erstmalig die trimeren Procyanidine (-)-Epicatechin-4 $\rightarrow$ 8-(-)-Epicatechin-4 $\rightarrow$ 8-(-)-Epicatechin, (-)-Epicatechin-4 $\rightarrow$ 8-(-)-Epicatechin-4 $\rightarrow$ 6-(-)-Epicatechin und (-)-Epicatechin-4 $\rightarrow$ 6-(-)-Epicatechin-4 $\rightarrow$ 8-(-)-Epicatechin und das tetramere Procyanidin (-)-Epicatechin-4 $\rightarrow$ 8-(-)-Epicatechin-4 $\rightarrow$ 8-(-)-Epicatechin-4 $\rightarrow$ 8-(-)-Epicatechin aus Silberlindenblüten isoliert und strukturell mittels NMR-

Spektroskopie aufgeklärt. Mit Hilfe des TEAC-Tests wurde nachgewiesen, dass diese im Extrakt enthaltenen Procyanidine den größten Beitrag zur antioxidativen Wirksamkeit leisteten.

Einen ebenfalls signifikanten Beitrag zur antioxidativen Wirksamkeit des Extraktes lieferten verschiedene phenolische Säuren wie Protocatchusäure, Vanillinsäure oder Gallussäure, die ebenfalls erstmalig aus Silberlindenblüten isoliert und mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert wurden. Im Vergleich zu den übrigen Inhaltsstoffen waren Flavonol-O-glykoside weniger antioxidativ wirksam. Einige wurden dennoch isoliert, strukturell aufgeklärt und konnten ebenfalls neu als Inhaltsstoffe von Silberlindenblüten beschrieben werden.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Material und Methoden

#### 5.1.1 Pflanzenmaterial

Holunderblüten – *Sambucus nigra* L.

Silberlindenblüten – *Tilia tomentosa*

Hopfendolden – *Humulus lupulus*

Zum Einsatz kamen getrocknete Holunderblüten, Silberlindenblüten und Hopfendolden, die von der Firma Plantextrakt bereitgestellt wurden. Über die Herkunft oder die Anbauregionen der einzelnen Pflanzen ist nichts bekannt.

#### 5.1.2 Chemikalien

ABTS	98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aceton-d <sub>6</sub>	99,8 %	Deutero GmbH, Kastellaun
Acetonitril	HPLC	Fisher, Scientific Loughb., UK
Amberlite® XAD-7		Fluka, Buchs, Schweiz
L (+)-Ascorbinsäure	reinst	Merck, Darmstadt
n-Butanol	p.a.	Fisher, Scientific Loughb., UK
(+)-Catechin-Hydrat	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
Chinasäure	reinst	Roth, Karlsruhe
5-Kaffeoylchinasäure	reinst	Fluka, Buchs, Schweiz
Dichlormethan	p.a.	Fisher, Scientific Loughb., UK
3,4-Dihydroxybenzoesäure (Protocatechusäure)	reinst	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid	HPLC	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid-d <sub>6</sub>	99,8 %	Deutero GmbH, Kastellaun
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	reinst	Fluka, Buchs, Schweiz
(-)-Epicatechin	reinst	Roth, Karlsruhe
Ethanol	p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethylacetat	p.a.	Fisher, Scientific Loughb., UK
Essigsäure	HPLC	Baker Analyzed HPLC Reagent, Groß Gerau
Ferulasäure	reinst	Fluka, Buchs, Schweiz
Folin-Ciocalteu Phenolreagenz		Merck, Darmstadt
Gallussäure-Monohydrat	reinst	Fluka, Buchs, Schweiz

$\beta$ -Glucuronidase		Sigma Aldrich
n-Hexan	p.a.	Fisher, Scientific Loughb., UK
Hippursäure	reinst	Merck, Darmstadt
Homovanillinsäure	reinst	Fluka, Buchs, Schweiz
Kaffeesäure	reinst	Merck, Darmstadt
Kaliumperoxodisulfat	p.a.	Riedel-de Haën, Seelze
Kämpferol	reinst	Roth, Karlsruhe
Kämpferol-glucosid	reinst	Roth, Karlsruhe
Kämpferol-3-rhamnoglucosid	reinst	Roth, Karlsruhe
Methanol	HPLC	Fisher, Scientific Loughb., UK
Methanol-d <sub>4</sub>	99,8 %	Merck, Darmstadt
Myricetin	reinst	Roth, Karlsruhe
Myricetin-glucosid	reinst	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	p.a.	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumcarbonat	p.a.	Merck, Darmstadt
o-Phosphorsäure	85 %	Riedel-de Haën, Seelze
Phloroglucinol	p.a.	Merck, Darmstadt
Protocatechusäure	reinst	Merck, Darmstadt
Quercetin	reinst	Roth, Karlsruhe
Quercetin-glucosid	reinst	Roth, Karlsruhe
Quercetin-3-rutinosid Trihydrat	reinst	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	37 %	Riedel-de Haën, Seelze
Sulfatase		Sigma Aldrich
<i>tert</i> -Butylmethylether	p.a.	
Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetra- methylchroman-2-carbonsäure)	> 98 %	Fluka, Buchs, Schweiz
Vanillinsäure	reinst	Merck, Darmstadt
Wasser, doppelt deionisiert		Nanopure®, Barnstead, W. Werner
Waters Oasis Festphasenkartuschen		WCX, MCX, HLB; 3cc; 6cc Milford, Mass, USA



## 5.2 Geräteparameter

### 5.2.1 Photometer

Gerät 1:	Spectrophotometer, Milton Roy Spectronic 301
Gerät 2:	Shimadzu UV 2101PC UV-VIS Scanning Spectralphotometer

### 5.2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

#### 5.2.2.1 Analytische Anlagen

##### Anlage 1:

Pumpe:	Agilent Series 1100, Binary Pump G1312A, Agilent Technologies (Waldbronn)
Autosampler:	Agilent Series 1100, ALS G1329A, Agilent Technologies (Waldbronn)
Säulenofen:	Agilent Series 1100, ALS Therm G1316A, Agilent Technologies (Waldbronn)
Detektor:	Agilent Series 1100, Colcom G1316A, Agilent Technologies (Waldbronn)
Datenverarbeitung:	ChemStation Software Version A.06.03, Agilent Technologies (Waldbronn)

##### Anlage 2:

Pumpe:	Agilent Series 1200, Binary Pump G1312A, Agilent Technologies (Waldbronn)
Autosampler:	Agilent Series 1200, ALS G1329A, Agilent Technologies (Waldbronn)
Säulenofen:	Agilent Series 1200, FC/ALS Therm G1330B, Agilent Technologies (Waldbronn)
Detektor:	Agilent Series 1200, DAD G1315D, Agilent Technologies (Waldbronn)
Datenverarbeitung:	ChemStation Software Version A.06.03, Agilent Technologies (Waldbronn)

#### 5.2.2.2 Präparative Anlage

Pumpe:	System Gold Programmable Solvent Module 116 (Beckman, San Ramon, USA)
Gradientenformer:	Niederdruckgradientenformer Model 250 B (Gynkotek, Germering)
Injektor:	Einspritzventil Beckman Altex, 0,1 oder 1 mL Schleife
Detektor:	System Gold Programmable Detektor Module 168 (Beckman, San Ramon, USA)
Steuereinheit:	PC-8300 (NEC, Tokyo, Japan)
Datenverarbeitung:	System Gold Personal Chromatography Software (Beckman, San Ramon, USA)

### 5.2.3 Massenspektrometer

**Anlage I:**

Massenspektrometer:	Bruker Esquire LC-MS/MS Electrospray Ionisation Ion Trap Multiple Mass Spectrometry (Bruker Daltonics, Bremen)	
Pumpe:	Agilent Series 1100, Agilent Technologies (Waldbronn)	
Autosampler:	Agilent Series 1200, Agilent Technologies (Waldbronn)	
Software:	Bruker Daltonics Version 4.5, HP ChemStation	
Parameter	Dry Gas Temp.:	365 °C
	Dry Gas Flow:	10 L/min
	Nebulizer Gas (N <sub>2</sub> ):	60 psi
	Capillary:	+ 3000 V
	End Plate Offset:	- 500 V
	Scan Range:	m/z 50 – 1200

**Anlage 2:**

Massenspektrometer:	Bruker HCT Ultra ETD II Discovery System (Bruker Daltonics, Bremen)	
Pumpe:	Agilent Series 1100, Agilent Technologies (Waldbronn)	
Autosampler:	Agilent Series 1200, Agilent Technologies (Waldbronn)	
Software:	HyStar 3.2 SR2	
Parameter	Dry Gas Temp.:	365°C
	Dry Gas Flow:	10 L/min
	Nebulizer Gas (N <sub>2</sub> ):	50 psi
	Capillary:	+ 3500 V
	End Plate Offset:	- 500 V
	Scan Range:	m/z 80-800

### 5.2.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

<b>Gerät 1:</b>	Bruker AMX-300
Messfrequenz:	<sup>1</sup> H: 300,1 MHz, <sup>13</sup> C: 75,5 MHz
Temperatur:	300,0 K
<b>Gerät 2:</b>	Bruker Avance II-600
Messfrequenz:	<sup>1</sup> H: 600,1 MHz; <sup>13</sup> C: 150,9 MHz
Temperatur:	301,2 K
<b>Gerät 3:</b>	Bruker ARX-400
Messfrequenz:	<sup>1</sup> H: 400 MHz
Temperatur:	240,0 K

### 5.2.5 High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)

Gerät:	High Speed Model CCC-1000, Pharma-Tech Research (Baltimore, MD, USA)
Coil:	Triplecoil, Teflonschlauch i.D. 2,5 mm
Coilvolumen:	850 mL
Pumpe:	System Gold Programmable Solvent Module 116 (Beckman, San Ramon, USA)
Detektor:	System Gold Programmable Detektor Module 166 (Beckman, San Ramon, USA)
Fraktionssammler:	Super Fraction Collector SF-2120 (Advantec Toyo Kaisha Ltd., Japan)
Datenverarbeitung:	LSW Chromatography Station

### 5.2.6 Spiral-Coil LSRCCC

Gerät:	Prototyp (Durchflusszentrifuge), Pharma-Tech Research (Baltimore, MD, USA)
Coil:	„convoluted“ Teflonschlauch i. D. 8,5 mm, gewickelt zu 10 Spiralen à ca. 560 mL
Coilvolumen:	5600 mL
Pumpe:	HPLC Pump 64, Knauer (Berlin)
Detektor:	Variable Wavelength Monitor, Knauer (Berlin)
Fraktionssammler:	Pharmacia LKB Super Frac
Schreiber:	ABB Goerz SE 120

### 5.2.7 Sonstige Geräte

Zentrifuge:	Hermle, Tischzentrifuge Z 383
Vortex:	Heidolph, Typ: Relax 1 R
Ultraschallbad:	Bandelin electronics, Typ: RK 100 H

### 5.2.8 Methoden

#### 5.2.8.1 Standardmethoden

##### 5.2.8.1.1 Haushaltsüblicher Teeaufguss

Ca. 2 g Probenmaterial (genau gewogen) werden mit 200 mL siedendem Wasser aufgebrüht. Nach einer Ziehzeit von exakt 10 Minuten wird der Aufguss filtriert.

##### 5.2.8.1.2 Methanolische Extraktion

Die methanolische Extraktion erfolgt analog der ISO 14502-1. Es wird angenommen, dass unter den dort angegebenen Bedingungen alle relevanten Verbindungen vollständig extrahiert werden.

0,2 g fein gemahlene Probe (Partikelgröße < 0,5 mm) werden mit 5 mL auf 70 °C temperiertem, 70 %igem Methanol versetzt und exakt 10 Minuten im Wasserbad bei 70 °C erhitzt. Zu Beginn der Extraktion, nach 5 Minuten und nach 10 Minuten wird die Probe durch Vortexbehandlung gut durchmischt.

Nach Abkühlen des Extrakts auf Raumtemperatur erfolgt eine Zentrifugation bei 3500 rpm für 10 Minuten. Der erhaltene Überstand wird in einen 10 mL Messkolben pipettiert; mit dem Rückstand wird eine zweite Extraktion analog dem oben beschriebenen Verfahren durchgeführt. Der Überstand wird ebenfalls in den 10 mL Messkolben pipettiert und anschließend mit 70 %igem Methanol bis zur Marke aufgefüllt.

#### **5.2.8.1.3 Extrahierbare Feststoffe**

Nach dem Abkühlen des wässrigen Extraktes (5.2.8.1.1) wurden 50 mL in ein Wägeschälchen pipettiert und bis zur Massenkonzanz im Trockenschrank bei 103°C getrocknet.

#### **5.2.8.1.4 Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes (Folin-Ciocalteu)**

Die Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes erfolgt als Summenparameter nach einer Modifikation der Methode von SINGLETON UND ROSSI (1965) und SINGLETON et al. (1999). Die Methode wird nach der für Tee in der ISO 14502-1 genormten Variante durchgeführt.

Das Prinzip der Methode beruht auf der leichten Oxidierbarkeit phenolischer Verbindungen. Leicht oxidierbare Stoffe wie Polyphenole oder Ascorbinsäure können im alkalischen Milieu aus Wolframat- und Molybdat-Ionen mit Phosphorsäure gebildete Komplexe zu blauen Farbpigmenten reduzieren. Die Intensität der entstehenden Färbung ist proportional zum Gehalt an oxidierbaren Stoffen und wird photometrisch bestimmt.

Die Konzentration wird in Bezug auf Gallussäure als Kalibrierstandard photometrisch bei einer Wellenlänge von 765 nm bestimmt.

#### Arbeitslösung und Standards

Die im Handel erhältliche 2N Folin-Ciocalteu-Lösung wird vor der Bestimmung 1:10 verdünnt. Dazu werden 10 mL in einen 100 mL-Messkolben überführt und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

Als Pufferlösung dient 7,5 %ige Natriumcarbonatlösung. 37,5 g wasserfreies  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  werden in einen 500 mL Messkolben eingewogen und zunächst in ca. 250 mL Wasser gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

Zum Ansetzen der Stammlösung für die Kalibrierung werden 0,110 g Gallussäure-Monohydrat in einen 100 mL-Messkolben möglichst genau eingewogen und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Dies entspricht einer Einwaage von ca. 1mg/mL wasserfreier Gallussäure. Von dieser Stammlösung werden 1, 2, 3, 4 und 5 mL in je einen 100 mL-Messkolben pipettiert und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Die Konzentrationen der Kalibrierlösungen entsprechen somit 10, 20, 30, 40 und 50 µg/mL Gallussäure.

### Messung

Gemessen werden die wässrigen Extrakte je nach Konzentration nach einer 1:10, 1:20 oder 1:50 Verdünnung und die methanolischen Extrakte nach einer 1:25, 1:50 bzw. 1:100 Verdünnung.

Der Reaktionsansatz erfolgt jeweils als Doppelbestimmung in 10 mL Messkolben. Von sämtlichen Kalibrier- und Extraktlösungen wird jeweils 1 mL vorgelegt. Zusätzlich wird ein Blindwert mit 1 mL Wasser angesetzt. Anschließend wird jeder Kolben über einen Dispenser mit 5 mL der Folin-Ciocalteu-Arbeitslösung und innerhalb von 3-8 min mit 4 mL der 7,5 %igen Natriumcarbonatlösung versetzt. Nach gründlichem Durchmischen werden die Kolben für mind. 60 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann in 10 mm Küvetten bei 765 nm photometrisch vermessen.

#### **5.2.8.1.5 Bestimmung der antioxidativen Aktivität**

Die Bestimmung der antioxidativen Kapazität erfolgte in Anlehnung an den von RE et al. (1999) entwickelten modifizierten TEAC-Test. Dieser basiert auf einer durch antioxidativ wirksame Verbindungen hervorgerufenen Entfärbung einer ABTS-Radikal-Kationen-Lösung.

#### **Erzeugung des ABTS<sup>•+</sup>-Radikals**

Es wurden genau 38,41 mg ABTS (7 mmol) mit 6,63 mg (2,45 mmol) Kaliumperoxodisulfat (Kaliumpersulfat,  $K_2S_2O_8$ ) in 10 mL Nanopure®-Wasser gelöst und zur Bildung des Radikals für 12 bis 16 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Diese Stammlösung ist danach für etwa sechs Wochen im Kühlschrank und im Dunkeln haltbar. Die Arbeitslösung ist täglich frisch anzusetzen. Dazu wurden 0,5 mL der Stammlösung mit etwa 50 mL Ethanol (p. A.,  $\geq 99,8\%$ ) versetzt und auf eine Extinktion von  $0,70 \pm 0,02$  eingestellt.

#### **Kalibrierung**

Eine Verdünnungsreihe der Standardsubstanz Trolox®, einem wasserlöslichen Vitamin-E-Derivat, diente zur Kalibrierung. Dazu sind genau 12,5 mg Trolox® in einen 10 mL-Messkolben eingewogen und mit Ethanol bis zur Marke aufgefüllt (5 mmol/L) worden. Ausgehend von dieser Stammlösung sind 250  $\mu$ L, 500  $\mu$ L, 750  $\mu$ L und 1000  $\mu$ L in je einen 5 mL-Messkolben überführt und ebenfalls mit Ethanol bis zur Marke aufgefüllt worden (0,25 mmol/L, 0,50 mmol/L, 0,75 mmol/L und 1,00 mmol/L). Vor jeder Messreihe wurde die Kalibrierung der frisch hergestellten ABTS-Arbeitslösung durchgeführt.

#### **Messung**

Gemessen wurden die Extrakte, Fraktionen der verschiedenen Trennungen, die isolierten Verbindungen und Standards. Jeweils 20  $\mu$ L Standard bzw. Probe wurden in Halbmikroküvetten (Kunststoff, Schichtdicke 10 mm) vorgelegt, mit 1,5 mL ABTS-Arbeitslösung versetzt und gründlich durchmischt. Nach genau 10 Minuten Reaktionszeit wurden die Extinktionen der Lösungen bei 734 nm gegen Luft gemessen.

### 5.2.8.1.6 Phloroglucinolyse

Die Phloroglucinolyse wurde in Anlehnung an KENNEDY und JONES (2001) durchgeführt. In dieser Arbeit wurde sie zur Bausteinanalyse der Procyanidine eingesetzt.

Herstellung der Reaktionslösung: 50 mg Ascorbinsäure und 250 mg Phloroglucinol wurden in 5 mL 0,1 N methanolischer Salzsäure gelöst. Die Lösung war täglich frisch herzustellen.

Ca. 0,1 mg der zu bestimmenden Procyanidine wurden mit 100 µL Reaktionslösung in ein 1,5 mL Vial gegeben und bei 50°C (vollständige Degradation) bzw. 30°C (teilweise Degradation) für 5 Minuten zur Reaktion gebracht. Anschließend wurden die Reaktionen durch Zugabe von 500 µL 40 mM wässriger Natriumacetat-Lösung gestoppt. Mittels HPLC-ESI-MS und HPLC-DAD wurden die Proben nach der Methode in Kap. 5.2.8.2.2 b) analysiert und die entstandenen Produkte identifiziert.

## 5.2.8.2 Analytische Methoden

### 5.2.8.2.1 Analytik der Holunderblüten

Fließmittel:	2% Essigsäure (A), Acetonitril (B)
Flussrate:	0,8 mL/min
Wellenlängen:	324 nm (Hydroxyzimtsäurederivate), 354 nm (Flavonoide)
Injektionsvolumen:	20 µL
Säulenofen:	25°C
Trennsäule:	Luna Phenyl-Hexyl 5 µm (250 x 4,6 mm i. D.), Phenyl-Vorsäule (4 x 3 mm i.D.), Phenomenex
Gradient:	0 min 6 % B, 15 min 17 % B, 30 min 30 % B, 40 min 50 % B, 42 min 95 % B, 50 min 95 % B, 51 min 6 % B, 60 min 6 % B

### 5.2.8.2.2 Analytik der Silberlindenblüten

#### a) Bestimmung der Flavonole und phenolischen Säuren

Fließmittel:	2% Essigsäure (A), Acetonitril (B)
Flussrate:	0,6 mL/min
Wellenlängen:	280 nm, 354 nm
Injektionsvolumen:	20 µL
Säulenofen:	25°C
Trennsäule:	Aqua C 18 125A 5µm (250 x 4,6 mm i. D.), Vorsäule (4 x 3 mm i.D.), Phenomenex
Gradient:	0 min 10 % B, 25 min 15 % B, 40 min 17,5 % B, 65 min 27,5 % B, 75 min 35 % B, 80 min 40 % B, 85 min 95 % B, 92 min 95 % B, 93 min 10 % B, 100 min 10 % B

## b) Procyanidine und Phloroglucinolyse

Fließmittel:	2% Essigsäure (A), Acetonitril (B)
Flussrate:	0,8 mL/min
Wellenlängen:	280 nm
Injektionsvolumen:	20 µL
Säulenofen:	25°C
Trennsäule:	Aqua C 18 125A 5µm (250 x 4,6 mm i. D.), Vorsäule (4 x 3 mm i.D.), Phenomenex
Gradient:	0 min 3 % B, 25 min 10 % B, 45 min 35 % B, 50 min 75 % B, 55 min 75 % B, 60 min 3 % B, 70 min 3 % B

**5.2.8.2.3 Analytik der Hopfenzapfen**

Fließmittel:	2% Essigsäure (A), Acetonitril (B)
Flussrate:	0,7 mL/min
Wellenlängen:	280, 324 und 354 nm
Injektionsvolumen:	20 µL
Säulenofen:	25°C
Trennsäule:	Luna Phenyl-Hexyl 5 µm (250 x 4,6 mm i. D.), Phenyl-Vorsäule (4 x 3 mm i.D.), Phenomenex
Gradient:	0 min 5 % B, 20 min 14 % B, 40 min 25 % B, 50 min 30 % B, 60 min 50 % B, 62 min 95 % B, 70 min 95 % B, 71 min 5 % B, 78 min 5 % B

**5.2.8.2.4 Berechnung der Gehalte der Flavonol-O-glykoside, Hydroxyzimtsäurederivate und Procyanidine**

## 5.2.8.2.4.1 Flavonol-O-glykoside

Für die Erstellung der Kalibriergeraden wurden folgende Standards verwendet:

- Quercetin-3-rutinosid (Trihydrat),  $M_r = 664,58 \text{ g/mol}$
- Kämpferol-3-rhamnoglucosid,  $M_r = 582,51 \text{ g/mol}$

Zur Umrechnung auf die jeweiligen Aglykone Quercetin und Kämpferol wurde die Formel

$$\text{Aglykon [g]} = \frac{\text{EW (Glykosid)}[\text{g}] \times M (\text{Aglykon})}{M (\text{Glykosid})}$$

verwendet.

Die Berechnung als Glykosid erfolgte nach der Gleichung:

$$\text{Glykosid [mg/kg]} = \frac{(y - b) \times VF \times 1000}{a \times EW [g]} \times \frac{M (\text{Glykosid})}{M (\text{Aglykon})}$$

y	Peakfläche (bei 354 nm)
b	Achsenabschnitt aus der Kalibriergeraden
VF	Verdünnungsfaktor
M	Molekulargewicht [g/mol]
a	Steigung
EW	Einwaage des Pflanzenmaterials [g]

Mit Hilfe der DIN-Norm 32645 konnten folgende Bestimmtheitsmaße, Bestimmungsgrenzen und Nachweisgrenzen ermittelt werden:

	Bestimmtheitsmaß (R <sup>2</sup> )	Bestimmungsgrenze [g/L]	Nachweisgrenze [g/L]
Kämpferol	0,9989	0,430	0,021
Quercetin	0,9995	0,845	0,055
Rutin	0,9995	0,249	0,069

#### 5.2.8.2.4.2 Hydroxyzimtsäurederivate

Die Gehalte der Hydroxyzimtsäurederivate wurden anhand einer Eichgeraden der Chlorogensäure (5-Kaffeoylchinasäure) bestimmt.

Die Berechnung erfolgte nach der Gleichung:

$$x [\text{mg/kg}] = \frac{(y - b) \times VF \times 1000}{a \times EW [g]} \times \frac{M (x)}{M (\text{Chlorogensäure})}$$

x	zu bestimmendes Hydroxyzimtsäurederivat
y	Peakfläche (bei 324 nm)
b	Achsenabschnitt aus der Kalibriergeraden
VF	Verdünnungsfaktor
M	Molekulargewicht [g/mol]
a	Steigung aus der Kalibriergeraden
EW	Einwaage des Pflanzenmaterials [g]

Mit Hilfe der DIN-Norm 32645 konnte ein Bestimmtheitsmaß von 0,9985, eine Bestimmungsgrenze von 1,960 g/L sowie eine Nachweisgrenze von 0,079 g/L ermittelt werden.



#### 5.2.8.2.4.3 Proanthocyanidine

Alle Procyanidingehalte wurden aufgrund der fehlenden Standardsubstanzen als Epicatechin-Äquivalente berechnet. Um Ungenauigkeiten zu umgehen, wurden keine Responsefaktoren in die Rechnung einbezogen. Mit Hilfe einer erstellten Epicatechin-Kalibriergeraden wurden die Gehalte folgendermaßen bestimmt:

$$x \text{ [mg/kg]} * = \frac{(y - b) \times VF \times 1000}{a \times EW \text{ [g]}}$$

x	zu bestimmendes Procyanidin
*	angegeben als Epicatechin-Äquivalent
y	Peakfläche (bei 280 nm)
b	Achsenabschnitt aus der Kalibriergeraden
VF	Verdünnungsfaktor
a	Steigung aus der Kalibriergeraden
EW	Einwaage des Pflanzenmaterials [g]

Mit Hilfe der DIN-Norm 32645 konnte ein Bestimmtheitsmaß von 1, eine Bestimmungsgrenze von 0,220 g/L sowie eine Nachweisgrenze von 0,016 g/L ermittelt werden.

### 5.2.8.3 Präparative Methoden

#### 5.2.8.3.1 Herstellung der Extrakte

200 g bzw. 300 g eines Feinschnitts aus Holunderblüten bzw. Silberlindenblüten wurden unter Rühren mit 750 mL Ethanol (50 %) bzw. Methanol (75 %) bei 60 °C für etwa eine Stunde extrahiert. Nach Filtration wurde der Rückstand erneut mit 750 mL Ethanol (50 %) bzw. Methanol (75 %) bei 60 °C für etwa eine Stunde und unter Rühren extrahiert. Nach der Filtration wurden beide Filtrate vereinigt und zur Entfernung von Chlorophyllen mindestens 5 x mit 50 mL *n*-Hexan ausgeschüttelt. Die Hexanphasen wurden vereinigt, mittels Rotationsverdampfer eingeeengt und schließlich gefriergetrocknet. Anschließend wurde die wässrig-alkoholische Phase zunächst mit Dichlormethan und anschließend mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Gleiche Phasen wurden vereinigt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand gefriergetrocknet.

#### 5.2.8.3.2 Herstellung eines XAD-7 Extraktes

Die weitere Aufreinigung des Rohextraktes erfolgte über XAD-7 Säulenchromatographie (Säule: 50 x 3 cm; ca. 250 g XAD-7). Nach Reinigung des Säulenmaterials mit Methanol und Konditionieren mit ca. 2 L Wasser wurden jeweils 3-4 g Rohextrakt, gelöst in ca. 15 mL Wasser, auf die Säule aufgegeben und 30 min stehen gelassen. Anschließend wurde mit ca. 1 L Wasser gewaschen und schließlich mit etwa 500 mL Methanol eluiert. Das Eluat wurde daraufhin am Rotationsverdampfer vom Methanol befreit und der wässrige Rückstand gefriergetrocknet.

### 5.2.8.3.3 Isolierung mittels präparativer HPLC

Für die Isolierungen mittels präparativer HPLC wurden die Fließmittel Acetonitril, Methanol, Nanopure® und 2 % Essigsäure verwendet. Je nach Polarität bestand Fließmittel B meist aus Acetonitril bzw. Methanol und Fließmittel A aus Nanopure® (Procyanidine) oder 2 % iger Essigsäure (Flavonol-O-glykoside und phenolische Säuren). Die Messwellenlänge wurde je nach der zu isolierenden Verbindung bei 280 nm (Procyanidine und phenolische Säuren) oder 354 nm (Flavonol-O-glykoside) gewählt. Je nach Polarität der zu bearbeitenden Fraktion wurden Flussrate und Gradienten entsprechend verändert. Zum Einsatz kamen die präparativen Trennsäulen Hypersil 120 ODS 5 µm (250 x 16 mm) mit Vorsäule der Firma M & W Chromatographietechnik GmbH, Aqua C18 125A 5 µm (250 x 10 mm) mit Vorsäule der Firma Phenomenex und Aqua C18 125A 5 µm (250 x 21,20 mm) mit Vorsäule der Firma Phenomenex.

## 5.3 Humanstudie (durchgeführt am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung / Leibniz Universität Hannover)

### 5.3.1 Studiendesign

Titel der Studie	Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Flavonoiden aus Rooibos- und Holunderblütentee in Plasma und Urin nach einmaliger Verabreichung
Prüfprodukte	Flavonoidhaltige Prüfprodukte: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Holunderblütentee</li> <li>- isolierte Flavonoidfraktion aus Holunderblütentee</li> </ul>
Studiendesign	monozentrische, offene, vergleichende Cross-over-Studie
Studiendauer	Die Studie besteht insgesamt aus drei Studienphasen, in denen jeweils zwei der flavonoidhaltigen Prüfprodukte und Placebo getestet werden. Eine Studienphase umfasst einen vierwöchigen Untersuchungszeitraum: dieser beginnt mit einer 14-tägigen Depletionsphase. Es schließen sich drei Untersuchungsphasen (je ein Tag) an, die jeweils von einer einwöchigen Auswaschphase unterbrochen werden.
Probanden	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Einwilligungsfähige gesunde Männer im Alter zwischen 18-40 Jahren</li> <li>- schriftliche Einwilligung der Probanden nach ausführlicher mündlicher und schriftlicher Aufklärung über die Studieninhalte, -anforderungen und -risiken</li> <li>- Fähigkeit und Bereitschaft der Studienteilnehmer, den Anweisungen des Prüfers und des Arztes zu folgen (Einhalten der Studien- sowie Ernährungsbedingungen vor und während der Intervention, etc.)</li> </ul>

Verbote/ Ausgrenzungen	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Einnahme von flavonoidhaltigen Supplementen (z.B. Sambucol) während der Depletionsphase und des Untersuchungszeitraumes</li> <li>- schwerwiegende chronische Erkrankungen (Nieren- und Leberinsuffizienz, kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes etc.) sowie andere schwerwiegende internistische Erkrankungen, insbesondere Malignome</li> <li>- Unmittelbare Notwendigkeit eines chirurgischen Eingriffs</li> <li>- chronische Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts (speziell Dünndarm, Leber, Pankreas, z. B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, Pankreasinsuffizienz, Sprue, Enterokolitis, Cholestase, Kurzdarmsyndrom) sowie Zustand nach operativen Eingriffen am Gastrointestinaltrakt (z. B. Gastrektomie)</li> <li>- bei bestehenden ernsthaften Verdauungsproblemen (Motilitätsstörungen, Obstipation)</li> <li>- diagnostizierte Gerinnungsstörung und/oder Einnahme gerinnungshemmender Medikamente (z.B. Marcumar)</li> <li>- regelmäßige Einnahme von Laxanzien</li> <li>- bekannte Allergie oder Unverträglichkeit gegen einen Bestandteil der Prüfprodukte</li> <li>- Alkohol-, Drogen-und/oder Medikamentenabhängigkeit</li> <li>- Raucher</li> <li>- Nicht einwilligungsfähige Probanden</li> <li>- Verweigerung bzw. Rücknahme der Einwilligung durch den Probanden</li> <li>- gleichzeitige Teilnahme an einer anderen klinischen Studie bzw. Teilnahme innerhalb der vergangenen 30 Tage</li> </ul>
Depletionsphase	<p>Nahrungsmittel, die während der Depletionsphase und des Untersuchungszeitraums gemieden werden sollten:</p> <p><b>Gemüse:</b> Grünkohl, Brokkoli, Grüne Bohnen, Sellerie, Aubergine Zwiebel</p> <p><b>Obst:</b> Apfel, Apfelsinen, Aronia, Grapefruit, Holunderbeeren, Schwarze Johannisbeeren, Rote Trauben</p> <p><b>Getränke:</b> Rotwein, Grüner Tee, Schwarzer Tee, Johannisbeersaft, Holunderbeersaft, Apfelsinensaft, Roter Traubensaft, Grapefruitsaft</p>
	<p>Die Studie besteht insgesamt aus drei Studienphasen. Die drei Studienphasen gleichen sich im Ablauf, unterscheiden sich aber in den Prüfprodukten, die verabreicht werden. Pro Studienphase sollen zwei Verumpräparate und ein</p>

	<p>Placebopräparat getestet werden.</p> <p><u>Beschreibung einer Studienphase</u></p> <p>Die Studienphase geht insgesamt über vier Wochen und beginnt mit einer 14-tägigen Depletionsphase. An diese schließen sich drei Untersuchungsphasen (je ein Tag) an, die jeweils durch eine einwöchige Auswaschphase unterbrochen werden. An jedem der Untersuchungstage erhält der Proband eines der Prüfprodukte, so dass der Proband jedes der in dieser Studienphase zu prüfenden Produkte einmal einnimmt (Cross-over-Design).</p> <p>Während der 14-tägigen Depletionsphase sollen die Probanden flavonoidhaltige Supplemente absetzen und flavonoidreiche und –angereicherte Lebensmittel meiden. Dies dient dazu, die Serumspiegel auf ein einheitliches Ausgangsniveau zu bringen.</p> <p>Daran schließen sich drei Untersuchungsphasen an, die jeweils von einer einwöchigen Auswaschphase unterbrochen werden. Während dieser Zeit sollen sich die Probanden ebenfalls flavonoidarm ernähren und den Verzehr von flavonoidhaltigen Supplementen vermeiden.</p> <p>An den Untersuchungstagen erfolgen zunächst die Abnahme der ersten Nüchternblut- und Urinprobe (Basiswert). Im Anschluss erhalten die Probanden die entsprechenden Prüfprodukte zusammen mit einem standardisierten Frühstück, das innerhalb von max. 10 min verzehrt werden soll.</p> <p>Genau 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5 und 8 h nach Konsum der Getränke (Prüfprodukte) erfolgen weitere Blutabnahmen.</p> <p>Nach Gabe der Getränke werden fünf Urinpools über folgende Zeiträume gesammelt: 0-2 h, 2-4 h, 4-6 h, 6-8 h und 8-24 h.</p> <p>Zusätzlich werden am ersten Untersuchungstag verschiedene anthropometrische Daten erhoben. Um einheitliche Studienbedingungen zu gewährleisten, erhalten die Teilnehmer zwischen der Nüchtern- und der 24 h-Urinsammlung standardisierte Mahlzeiten und Getränke.</p>
--	--

### 5.3.2 Probenvorbereitung und Analytik der Plasmaproben

#### 5.3.2.1 Plasmagewinnung

Das zur Analytik benötigte Plasma wurde von den Kooperationspartnern im Institut für Lebensmittelwissenschaft und Ökotoxikologie der Leibniz Universität Hannover durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 2000 g aus dem Vollblut gewonnen. Jeweils 1 mL des entstandenen Überstandes wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Um eine Blutgerinnung zu verhindern, wurde eine spezielle Konservierungslösung, bestehend aus 20 µL Ascorbat-EDTA (0,4 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Puffer mit 20 % Ascorbinsäure und 0,1 % EDTA, pH 3,6) beigelegt.

#### 5.3.2.2 Aufarbeitung der Plasmaproben zur Analytik mittels HPLC-ESI-MS

1000 µL einer bei Raumtemperatur aufgetauten Plasmaprobe wurden mit 200 µL eines Phosphat-EDTA-Puffers (pH 3,5) versetzt und anschließend für eine Minute mittels Vortex durchmischt. Im Anschluss daran wurde die Plasma-Puffer-Mischung mit 2,5 mL eines Gemisches aus Ethylacetat/Methanol (1:1, v:v) versetzt und wieder für eine Minute mittels Vortex durchmischt. Nach einer 30-minütigen Ultraschallbehandlung wurde die Suspension abermals für eine Minute durchmischt und anschließend für 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme der organischen Phase wurde der Rückstand mit 2,5 mL Ethylacetat nochmals nach der oben beschriebenen Vorgehensweise extrahiert. Nach Vereinigung beider organischer Phasen und Zusatz von 20 µL einer 1 % Ascorbinsäure wurde die Lösung unter Stickstoff bis zur Trockne eingedunstet. Der so erhaltene Rückstand wurde in 70 µL Acetonitril sowie 70 µL Dimethylformamid aufgenommen, 1 Minute durchmischt und 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 100 µL µ-Vial pipettiert und zur HPLC-ESI-MS eingesetzt.

#### 5.3.2.3 LC-ESI-MS-Methode zur Bestimmung von Metaboliten bzw. unveränderten Verbindungen in Urin und Plasma

Fließmittel:	2% Essigsäure (A), Acetonitril (B)
Flussrate:	0,6 mL/min
Wellenlängen:	280, 354, 324, 450 nm
Injektionsvolumen:	20 µL
Trennsäule:	Aqua C 18 125A 5µm (250 x 4,6 mm i. D.), Vorsäule (4 x 3 mm i.D.), Phenomenex
Gradient:	0 min 6 % B, 20 min 20 % B, 40 min 30 % B, 50 min 40 % B, 65 min 70 % B, 68 min 95 % B, 78 min 95 % B, 80 min 6 % B, 88 min 6 % B

#### 5.3.2.4 Wiederholpräzision und Vergleichspräzision

Für die Bestimmung der Wiederholpräzision wurden 6 Aliquote einer Plasmaprobe entnommen (hier: 0,2 mL), mit 20 µL eines internen Standards versetzt (Quercetin-3-rutinosid (Trihydrat), c = 1 mg/mL) und wie in 5.3.2.2 extrahiert und anschließend bis zur Trockne eingedunstet. Der Rückstand wurde in 70 µL Dimethylformamid sowie 70 µL Acetonitril aufgenommen und so mittels HPLC-ESI-MS analysiert.

**Tabelle 14** gibt die ermittelten Flächeninhalte des Standards wieder sowie Mittelwerte, Standardabweichung und relative Standardabweichung.

**Tabelle 14:** Bestimmung der Wiederholpräzision nach Aufarbeitung einer Plasmaprobe

	Fläche	Mittelwert	SD	rel. SD
Probe 1	12354	12430	642	5,16 %
Probe 2	11967			
Probe 3	13008			
Probe 4	12598			
Probe 5	11472			
Probe 6	13179			

Für die Bestimmung der Vergleichspräzision der Methode (**Tabelle 15**) wurden insgesamt 8 Aliquote einer Plasmaprobe entnommen, mit einem Standard versetzt und nach 5.3.2.2 aufgearbeitet. Für die Bestimmung der Vergleichspräzision wurden die Aufarbeitungen jeweils als Doppelbestimmung von 2 verschiedenen Personen an 2 verschiedenen Tagen durchgeführt. Dabei wurden jeweils 2 Aliquote von Person 1 an Tag 1, 2 Aliquote von Person 2 an Tag 1, 2 Aliquote von Person 1 an Tag 2 usw. bearbeitet.

**Tabelle 15:** Bestimmung der Vergleichspräzision nach Aufarbeitung einer Plasmaprobe von verschiedenen Personen an unterschiedlichen Tagen

	Fläche	Mittelwert	SD	rel. SD
Probe 1	11176	11482	634	5,52 %
Probe 2	11791			
Probe 3	10942			
Probe 4	12063			
Probe 5	10813			
Probe 6	11946			
Probe 7	12376			
Probe 8	10749			

### 5.3.2.5 Kalibrierung und Quantifizierung der Metabolite im Plasma

Die Quantifizierung der identifizierten Metabolite im Plasma erfolgte über die jeweiligen Extract Ion Chromatogramme. Dazu wurden Konzentrationsreihen jeder Referenzsubstanz angefertigt und mit Hilfe der zugehörigen Peakflächen, Regressionsgeraden erstellt. Deren Geradengleichungen dienten als Kalibrierfunktionen und lieferten folgende Kalibrierbereiche: für Chinasäure zwischen 0,24-46,98  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , für Dihydroferulasäure zwischen 0,07-14,86  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , für Ferulasäure zwischen 0,166-33,25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , für Homovanillinsäure zwischen 2,94-58,77  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  und für Quercetinsulfat zwischen

0,034-6,79  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Da nicht alle Metabolite als Referenzsubstanzen vorhanden waren, wurden einige Metabolite über ihre Molare Masse anhand eines strukturähnlichen Flavonoids quantifiziert. Die Proben, die außerhalb des Kalibrierbereichs lagen, wurden entsprechend verdünnt.

Nach der DIN Methode 32645 wurden folgende Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt:

	Nachweisgrenze [ $\mu\text{mol/L}$ ]	Bestimmungsgrenze [ $\mu\text{mol/L}$ ]
Chinasäure	0,014	0,198
Dihydroferulasäure	0,011	0,129
Ferulasäure	0,134	0,172
Homovanillinsäure	2,702	4,415
Quercetinsulfat	0,031	0,467

### 5.3.2.6 Aufarbeitung der Urinproben zur Analyse mittels HPLC-ESI-MS

#### a) SPE Aufarbeitung

5000  $\mu\text{L}$  einer bei Raumtemperatur aufgetauten Urinprobe wurden mit 500  $\mu\text{L}$  einer 85%igen Phosphorsäure versetzt und anschließend für eine Minute mittels Vortex durchmischt. Für die Konditionierung der HLB-Waters-Kartusche wurde diese nacheinander mit 5 mL einer 0,01%igen Salzsäure, 5 mL Methanol und wieder mit 5 mL einer 0,01 %igen Salzsäure vorgespült. Im Anschluss daran wurde die Urin-Probeflösung auf die Kartusche gegeben, mit ca. 1 Tropfen/2 sec eingezogen und für 10 min einwirken gelassen. Anschließend wurde mit 2 mL 0,01 %iger Salzsäure gewaschen. Die Elution erfolgte mit 6 x 500  $\mu\text{L}$  Methanol (mit 0,01 % Salzsäure) und schließlich mit 1 x 500  $\mu\text{L}$  einer Methanol/Dimethylformamid Mischung. Nach Zusatz von 20  $\mu\text{L}$  einer 1 %igen Ascorbinsäure wurde die Lösung unter Stickstoff bis zur Trockne eingeeengt. Der so erhaltene Rückstand wurde in 70  $\mu\text{L}$  Acetonitril sowie 70  $\mu\text{L}$  Dimethylformamid aufgenommen, 1 Minute durchmischt und 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 100  $\mu\text{L}$   $\mu$ -Vial pipettiert und zur HPLC-ESI-MS eingesetzt.

#### b) Direktinjektion nach Membranfiltration

1000  $\mu\text{L}$  einer bei Raumtemperatur aufgetauten Urinprobe wurden mit Hilfe eines 45  $\mu\text{m}$  Membranfilters filtriert, in ein Vial abgefüllt und zur HPLC-ESI-MS eingesetzt.

### 5.3.2.7 Wiederholpräzision und Vergleichspräzision

Für die Bestimmung der Wiederholpräzision wurden 6 Aliquots einer Urinprobe entnommen (hier: 0,2 mL), mit 20  $\mu\text{L}$  eines internen Standards versetzt (Quercetin-3-rutinosid,  $c = 1 \text{ mg/mL}$ ), membranfiltriert und zur HPLC-ESI-MS eingesetzt. **Tabelle 16** gibt die ermittelten Flächeninhalte des Standards wieder sowie Mittelwerte, Standardabweichung und relative Standardabweichung.

**Tabelle 16:** Bestimmung der Wiederholpräzision nach Aufarbeitung einer Urinprobe

	Fläche	Mittelwert	SD	rel. SD
Probe 1	19972	19903	105	0,53 %
Probe 2	19734			
Probe 3	19996			
Probe 4	19811			
Probe 5	19935			
Probe 6	19967			

Für die Bestimmung der Vergleichspräzision der Methode (**Tabelle 17**) wurden insgesamt 8 Aliquots einer Urinprobe entnommen, mit einem Standard versetzt, membranfiltriert und zur HPLC-ESI-MS eingesetzt. Für die Bestimmung der Vergleichspräzision wurden die Aufarbeitungen jeweils als Doppelbestimmung von 2 verschiedenen Personen an 2 verschiedenen Tagen durchgeführt. Dabei wurden jeweils 2 Aliquots von Person 1 an Tag 1, 2 Aliquots von Person 2 an Tag 1, 2 Aliquots von Person 1 an Tag 2 usw. bearbeitet.

**Tabelle 17:** Bestimmung der Vergleichspräzision nach Aufarbeitung einer Urinprobe von verschiedenen Personen an unterschiedlichen Tagen

	Fläche	Mittelwert	SD	rel. SD
Probe 1	19473	19787	165	0,83 %
Probe 2	19864			
Probe 3	19981			
Probe 4	19697			
Probe 5	19937			
Probe 6	19794			
Probe 7	19867			
Probe 8	19682			

### 5.3.2.8 Kalibrierung und Quantifizierung der Metabolite im Urin

Die Quantifizierung der identifizierten Metabolite im Urin erfolgte über die jeweiligen Extract Ion Chromatogramme. Dazu wurden Konzentrationsreihen für jede Referenzsubstanz angefertigt und mit Hilfe der zugehörigen Peakflächen Regressionsgeraden erstellt. Deren Geradengleichungen dienten als Kalibrierfunktionen und lieferten folgende Kalibrierbereiche: für 5-Feruloylchinasäure zwischen  $0,07\text{--}22,79 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , für Hippursäure zwischen  $2,73\text{--}54,53 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , für Homovanillinsäure zwischen  $2,94\text{--}58,77 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , für Homovanillinsäuresulfat zwischen  $4,22\text{--}84,60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , für 5-Kaffeoylchinasäure zwischen  $0,11\text{--}21,92 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , für Kämpferolglucuronid zwischen  $0,04\text{--}8,21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  und für Quercetinglucuronid zwischen  $0,04\text{--}8,49 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Da nicht alle Metabolite als Referenzsubstanzen vorhanden waren, wurden einige Metabolite über ihre Molare Masse anhand eines strukturähnlichen Flavonoids quantifiziert.



Die Proben, die außerhalb des Kalibrierbereichs lagen, wurden entsprechend verdünnt.

Nach der DIN Methode 32645 wurden folgende Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt:

	Nachweisgrenze [ $\mu\text{mol/L}$ ]	Bestimmungsgrenze [ $\mu\text{mol/L}$ ]
5-Feruloylchinasäure	0,069	0,841
Hippursäure	0,145	1,891
Homovanillinsäure	2,702	4,415
Homovanillinsäuresulfat	1,770	2,893
5-Kaffeoylchinasäure	0,072	0,875
Kämpferolglucuronid	0,017	0,030
Quercetinglucuronid	0,016	0,028

## 5.4 Physikalisch-chemische Charakterisierung der isolierten Verbindungen

### (-)-Epicatechin

Herkunft: *Tilia tomentosa flos*

Summenformel:  $C_{15}H_{14}O_6$

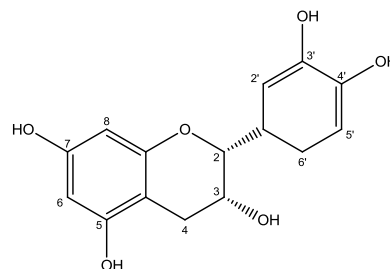
Molekülmasse: 290,27 g/mol

UV ( $\lambda_{\max}$ ): 278 nm

ESI-MS (neg. Modus):  $m/z$  289  $[M-H]^-$ , 245

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CD_3OD$ , ppm): 2,73 (dd,  $J_1 = 2,7$  Hz,  $J_2 = 16,8$  Hz,  $H_{4ax}$ ), 2,87 (dd,  $J_1 = 4,5$  Hz,  $J_2 = 16,8$  Hz,  $H_{4aq}$ ), 3,31 (s,  $H_3$ ), 4,17 (br. s,  $H_2$ ), 5,93 (d,  $J = 2,4$  Hz,  $H_6$ ), 5,96 (d,  $J = 2,4$  Hz,  $H_8$ ), 6,75 (d,  $J = 8,1$  Hz,  $H_5'$ ), 6,80 (dd,  $J_1 = 1,6$  Hz,  $J_2 = 8,2$  Hz,  $H_6'$ ), 6,97 (d,  $J = 1,6$  Hz,  $H_2'$ )

$^{13}C$ -NMR (75 MHz,  $CD_3OD$ , ppm): 29,2 ( $C_4$ ), 68,0 ( $C_3$ ), 80,1 ( $C_2$ ), 96,6 ( $C_6$ ), 97,1 ( $C_8$ ), 100,0 ( $C_4\ddot{a}q$ ), 116,5 ( $C_2'$ ), 120,1 ( $C_5'$ ), 132,3 ( $C_1'$ ), 145,7-146,0 ( $C_3'$ ,  $C_4'$ ), 157,0-158,0 ( $C_5$ ,  $C_7$ )



### 3,4-Dihydroxybenzoesäure (Protocatechusäure)

Herkunft: *Tilia tomentosa flos*

Summenformel:  $C_7H_6O_4$

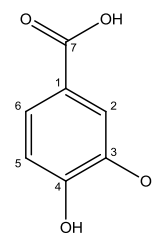
Molekülmasse: 154,12 g/mol

UV ( $\lambda_{\max}$ ): 257 nm

ESI-MS (neg. Modus):  $m/z$  153  $[M-H]^-$ , 109

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CD_3OD$ , ppm): 6,80 (d,  $J = 8,1$  Hz,  $H_5$ ), 7,45 (d,  $J_1 = 1,3$  Hz,  $H_6$ ), 7,46 (d,  $J = 1,2$  Hz,  $H_2$ )

$^{13}C$ -NMR (75 MHz,  $CD_3OD$ , ppm): 117,1 ( $C_2$ ,  $C_5$ ), 123,7 ( $C_1$ ,  $C_6$ ), 146,0 ( $C_3$ ), 151,5 ( $C_4$ ), 170,4 ( $C_7$ )



### Quercetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (Quercetin-3-rhamnosid)

Herkunft: *Tilia tomentosa flos*

Summenformel:  $C_{21}H_{20}O_{11}$

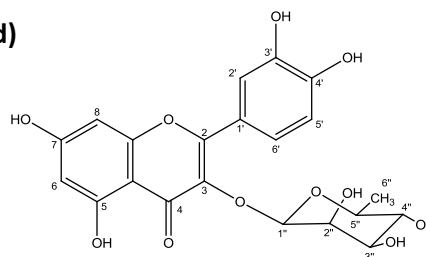
Molekülmasse: 448,38 g/mol

UV ( $\lambda_{\max}$ ): 356 nm

ESI-MS (neg. Modus):  $m/z$  447  $[M-H]^-$ , 301

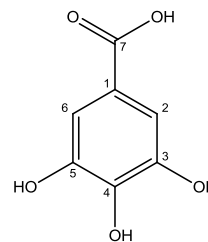
$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CD_3OD$ , ppm): 0,95 (d,  $J = 6,0$  Hz,  $H_{6''}$ ), 3,31 (m,  $H_{5''}$ ), 3,34 (d,  $J = 9,6$  Hz,  $H_{4''}$ ), 3,75 (dd,  $J_1 = 3,3$  Hz,  $J_2 = 9,6$  Hz,  $H_{3''}$ ), 4,22 (m,  $H_{2''}$ ), 5,36 (d,  $J = 1,3$  Hz,  $H_{1''}$ ), 6,20 (d, n.b.,  $H_6$ ), 6,37 (d, n.b.,  $H_8$ ), 6,91 (d,  $J = 8,3$  Hz,  $H_5'$ ), 7,30 (d,  $J = 8,3$  Hz,  $H_6'$ ), 7,34 (s,  $H_2'$ )

$^{13}C$ -NMR (75 MHz,  $CD_3OD$ , ppm): 17,0 ( $C_{6''}$ ), 71,2 ( $C_{2''}$ ), 71,3 ( $C_{5''}$ ), 71,6 ( $C_{3''}$ ), 72,1 ( $C_{4''}$ ), 93,9 ( $C_8$ ), 99,2 ( $C_6$ ), 103,7 ( $C_{1''}$ ), 105,9 ( $C_{10}$ ), 116,4 ( $C_{5'}$ ), 116,8 ( $C_{2'}$ ), 123,1 ( $C_{6'}$ ), 123,3 ( $C_{1'}$ ), 136,2 ( $C_3$ ), 146,9 ( $C_{3'}$ ), 149,7 ( $C_2$ ), 158,5 ( $C_9$ ), 159,1 ( $C_{4'}$ ), 163,4 ( $C_5$ ), 166,8 ( $C_7$ ), 179,6 ( $C_4$ )

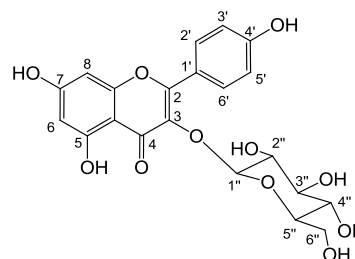


**3,4,5-Trihydroxybenzoesäure (Gallussäure)**Herkunft: *Tilia tomentosa flos*Summenformel:  $C_7H_6O_5$ 

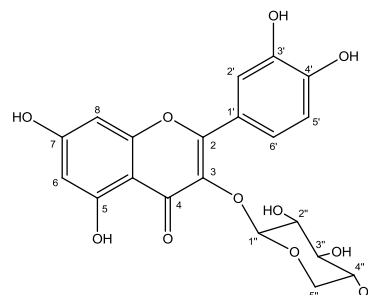
Molekülmasse: 170,12 g/mol

UV ( $\lambda_{\max}$ ): 228, 270 nmESI-MS (neg. Modus): m/z 169 [M-H]<sup>-</sup>, 125<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, ppm): 3,31 (s, 3/4/5 OH), 4,93 (s, H<sub>2</sub>/H<sub>6</sub>), 7,04 (s, 7 OH)<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD, ppm): 107-109 (C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>), 124 (C<sub>1</sub>), 138,8 (C<sub>4</sub>), 146,2 (C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>), 171,9 (C<sub>7</sub>)**Kämpferol-3-O-β-D-glucopyranosid (Kämpferol-3-glucosid)**Herkunft: *Tilia tomentosa flos*Summenformel:  $C_{21}H_{20}O_{11}$ 

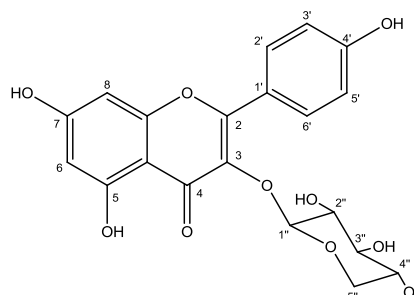
Molekülmasse: 448,38 g/mol

UV ( $\lambda_{\max}$ ): 354 nmESI-MS (neg. Modus): m/z 447 [M-H]<sup>-</sup>, 285<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): 3,12-3,84 (m, -glucose), 5,31 (d, J = 7,8 Hz, H<sub>1</sub>''), 6,20 (d, J = 1,8 Hz, H<sub>6</sub>), 6,39 (d, J = 1,8 Hz, H<sub>8</sub>), 6,87 (d, J = 8,8 Hz, H<sub>3</sub>', H<sub>5</sub>'), 8,08 (d, J = 8,8 Hz, H<sub>2</sub>', H<sub>6</sub>')**Quercetin-3-β-D-xylopyranosid (Quercetin-3-xylosid)**Herkunft: *Tilia tomentosa flos*Summenformel:  $C_{20}H_{18}O_{11}$ 

Molekülmasse: 434,35 g/mol

UV ( $\lambda_{\max}$ ): 356 nmESI-MS (neg. Modus): m/z 433 [M-H]<sup>-</sup>, 301<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): 2,92-3,61 (m, -xylose), 3,73 (d, J = 10,4 Hz, H<sub>5</sub>''), 5,31 (d, J = 7,0 Hz, H<sub>1</sub>''), 6,20 (d, J = 2,0 Hz, H<sub>6</sub>), 6,37 (d, J = 2,0 Hz, H<sub>8</sub>), 6,81 (d, J = 8,7 Hz, H<sub>5</sub>'), 7,50 (dd, J<sub>1</sub> = 2,0 Hz, J<sub>2</sub> = 9,0 Hz, H<sub>6</sub>', H<sub>2</sub>')<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): 69,8 (C<sub>5</sub>''), 74,0 (C<sub>4</sub>''), 76,6 (C<sub>2</sub>''), 77,4 (C<sub>3</sub>''), 93,1 (C<sub>8</sub>), 98,3 (C<sub>10</sub>), 100,9 (C<sub>6</sub>), 103,7 (C<sub>1</sub>''), 115,9 (C<sub>5</sub>'), 116,5 (C<sub>2</sub>'), 120,9 (C<sub>6</sub>'), 122,9 (C<sub>1</sub>'), 133,1 (C<sub>3</sub>), 145,0 (C<sub>4</sub>'), 148,8 (C<sub>3</sub>'), 156,1 (C<sub>2</sub>), 159,3 (C<sub>9</sub>), 161,2 (C<sub>5</sub>), 164,8 (C<sub>7</sub>), 177,3 (C<sub>4</sub>)**Kämpferol-3-β-D-xylopyranosid (Kämpferol-3-xylosid)**Herkunft: *Tilia tomentosa flos*Summenformel:  $C_{20}H_{18}O_{10}$ 

Molekülmasse: 418,35 g/mol

UV ( $\lambda_{\max}$ ): 354 nmESI-MS (neg. Modus): m/z 417 [M-H]<sup>-</sup>, 285

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm): 2,91-3,81 (m, -xylose), 2,92 (dd,  $J = 9,7$ ,  $J = 11,4$  Hz,  $\text{H5''}_{\text{ax}}$ ), 3,63 (dd,  $J = 5,2$  Hz,  $J = 11,4$  Hz,  $\text{H5''}_{\text{äq}}$ ), 5,31 (d,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{H1''}$ ), 6,12 (d,  $J = 2,0$  Hz,  $\text{H6}$ ), 6,30 (d,  $J = 2,0$  Hz,  $\text{H8}$ ), 6,90 (d,  $J = 8,8$  Hz,  $\text{H5'}$ ,  $\text{H3'}$ ), 8,01 (d,  $J = 8,9$  Hz,  $\text{H6'}$ ,  $\text{H2'}$ )

#### 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure (Vanillinsäure)

Herkunft: *Tilia tomentosa flos*

Summenformel:  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$

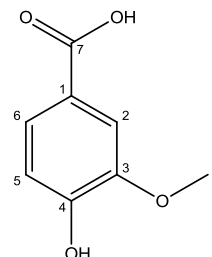
Molekülmasse: 168,15 g/mol

UV ( $\lambda_{\text{max}}$ ): 260 nm

ESI-MS (neg. Modus):  $m/z$  167  $[\text{M-H}]^-$ , 152, 123, 108

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , ppm): 3,75 (s,  $\text{H8}$ ), 4,93 (s, 7 OH, 4 OH), 6,84 (d,  $J = 8,7$ ,  $\text{H5}$ ), 7,55 (ddd,  $J < 2$  Hz,  $\text{H2}$ ,  $\text{H6}$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , ppm): 56,4 ( $\text{C8}$ ), 115 ( $\text{C2}$ ), 116,6 ( $\text{C5}$ ), 123,1 ( $\text{C1}$ ), 125,7 ( $\text{C6}$ ), 148,6 ( $\text{C4}$ ), 152,6 ( $\text{C3}$ ), 170,0 ( $\text{C7}$ )



#### 4-Hydroxybenzoesäure

Herkunft: *Tilia tomentosa flos*

Summenformel:  $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$

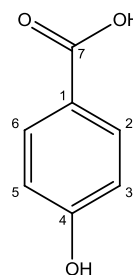
Molekülmasse: 138,12 g/mol

UV ( $\lambda_{\text{max}}$ ): 254 nm

ESI-MS (neg. Modus):  $m/z$  137  $[\text{M-H}]^-$ , 93

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , ppm): 3,26 (s, 4 OH), 4,90 (s, 7 OH), 6,82 (d,  $J = 8,7$ ,  $\text{H3}$ ,  $\text{H5}$ ), 7,87 (d,  $J = 8,7$  Hz,  $\text{H2}$ ,  $\text{H6}$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , ppm): 116,8 ( $\text{C3}$ ,  $\text{C5}$ ), 122,8 ( $\text{C1}$ ), 132,2 ( $\text{C2}$ ,  $\text{C6}$ ), 163,3 ( $\text{C4}$ ), 170,1 ( $\text{C7}$ )



#### 5-Kaffeoyl-(-)-Chinasäure (Chlorogensäure)

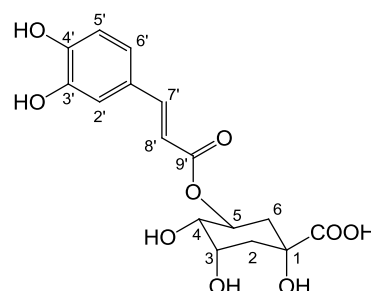
Herkunft: *Sambucus nigra L. flos*

Summenformel:  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$

Molekülmasse: 354,31 g/mol

UV ( $\lambda_{\text{max}}$ ): 280 und 320 nm

ESI-MS (neg. Modus):  $m/z$  353  $[\text{M-H}]^-$ , 191, 179, 161

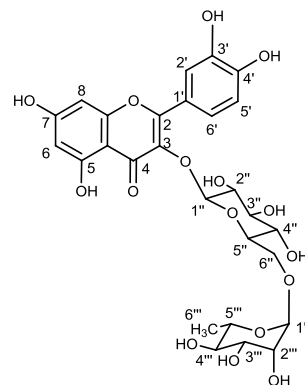


$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , ppm): 1,90-2,03 (m,  $\text{H2''}_{\text{äq}}$ ,  $\text{H6''}_{\text{ax}}$ ), 2,05-2,16 (m,  $\text{H2''}_{\text{ax}}$ ,  $\text{H6''}_{\text{äq}}$ ), 3,62 (dd,  $J = 3,1$  Hz,  $J = 8,6$  Hz,  $\text{H4}$ ), 4,07 (dd,  $J = 4,0$  Hz,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{H3}$ ), 5,24 (dt,  $J = 4,4$  Hz,  $J = 9,2$  Hz,  $\text{H5}$ ), 6,17 (d,  $J = 15,9$  Hz,  $\text{H8'}$ ), 6,68 (d,  $J = 8,2$  Hz,  $\text{H5'}$ ), 6,86 (dd,  $J = 2,0$  Hz,  $J = 8,2$  Hz,  $\text{H6'}$ ), 6,95 (d,  $J = 2,0$  Hz,  $\text{H2'}$ ), 7,46 (d,  $J = 15,9$  Hz,  $\text{H7'}$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , ppm): 38,3 ( $\text{C2}$ ), 38,9 ( $\text{C6}$ ), 71,5 ( $\text{C3}$ ), 72,1 ( $\text{C5}$ ), 73,6 ( $\text{C4}$ ), 76,3 ( $\text{C1}$ ), 115,3 ( $\text{C5'}$ ), 123,0 ( $\text{C6'}$ ), 127,8 ( $\text{C1'}$ ), 146,8 ( $\text{C3'}$ ), 147,1 ( $\text{C7'}$ ), 149,6 ( $\text{C4'}$ ), 168,7 ( $\text{C9'}$ ), 177,4 ( $\text{COOH}$ )

**Quercetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 6'')- $\beta$ -D-glucopyranosid  
(Quercetin-3-rutinosid)**

Herkunft: *Sambucus nigra* L. flos  
 Summenformel:  $C_{27}H_{30}O_{16}$   
 Molekülmasse: 610,52 g/mol  
 UV ( $\lambda_{\max}$ ): 358 und 254 nm  
 ESI-MS (neg. Modus): m/z 609 [M-H]<sup>-</sup>, 301

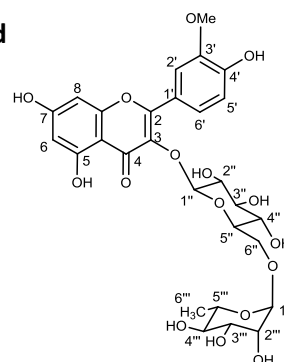


<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): 1,01 (d, J = 6,0 Hz, H6'''), 3,28-3,70 (m, H2'', H3'', H4'', H3''', H4'''), 3,62-3,80 (m, H2''', H5'''), 4,25-4,46 (m, H6''b, H5''), 4,95-5,10 (m, H6''b), 5,12 (s<sub>br</sub>, H1'''), 5,33 (d, J = 7,0 Hz, H1''), 6,20 (d, J = 2,0 Hz, H6), 6,39 (d, J = 2,0 Hz, H8), 6,86 (d, J = 9,0 Hz, H5'), 7,60 (d, J = 2,0 Hz, H2'), 7,62 (dd, J = 2,0; 9,0 Hz, H6')

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): 17,9 (C6'''), 67,8 (C6''), 68,9 (C5'''), 70,4 (C4''), 71,1 (C2'''), 71,4 (C3'''), 72,9 (C4'''), 74,7 (C2''), 76,8 (C5''), 77,4 (C3''), 94,2 (C8), 99,5 (C6), 101,3 (C1'''), 101,7 (C1''), 104,8 (C4a), 116,1 (C5'), 116,2 (C2'), 121,7 (C1'), 122,1 (C6'), 133,2 (C3), 144,6 (C3'), 148,3 (C4'), 156,3 (C8a), 156,5 (C2), 161,1 (C5), 163,9 (C7), 177,3 (C4)

**Isorhamnetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 6'')- $\beta$ -D-glucopyranosid  
(Isorhamnetin-3-rutinosid)**

Herkunft: *Sambucus nigra* L. flos  
 Summenformel:  $C_{28}H_{32}O_{16}$   
 Molekülmasse: 624,21 g/mol  
 UV ( $\lambda_{\max}$ ): 350 und 260 nm  
 ESI-MS (neg. Modus): m/z 623 [M-H]<sup>-</sup>, 315

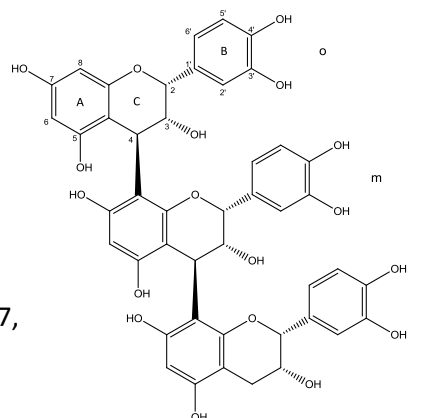


<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): 0,99 (d, J = 6,2 Hz, H6'''), 3,05 (dt, J = 4,7 Hz, J = 9,3 Hz, H4'''), 3,26 (ddd, J = 9,6 Hz, J = 8,6 Hz, J = 4,8 Hz, H4''), 3,28-3,60 (m, H3''', H3'', H2'', H6''a, H2''', H5'', H5'''), 3,71 (dd, J = 1,9 Hz, 10,8 Hz, H6''b), 3,83 (s, OCH<sub>3</sub>), 4,42 (d, J = 0,9, H1'''), 5,41 (d, J = 7,4 Hz, H1''), 6,10 (d, J = 1,9 Hz, H6), 6,32 (d, J = 1,9 Hz, H8), 6,90 (d, J = 8,4 Hz, H5'), 7,50 (dd, J = 1,9 Hz, J = 8,4 Hz, H6'), 7,85 (d, J = 2,0 Hz, H2')

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): 17,6 (C6'''), 55,5 (OCH<sub>3</sub>), 68,2 (C6''), 70,2 (C5'''), 71,7 (C4''), 72,2 (C2'''), 72,4 (C3'''), 74,2 (C4'''), 75,7 (C2''), 77,0 (C5''), 78,5 (C3''), 95,3 (C8), 100,8 (C6), 102,5 (C1'''), 105,2 (C1''), 114,7 (C2'), 115,9 (C5'), 124,3 (C6')

**(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin  
(Trimer C1)**

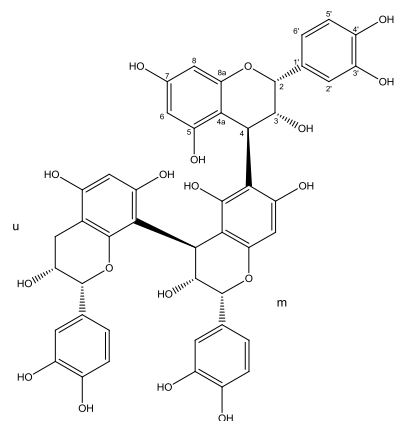
Herkunft:	<i>Tilia tomentosa flos</i>
Summenformel:	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
Molekülmasse:	866,77 g/mol
UV ( $\lambda_{\max}$ ):	230 und 280 nm
ESI-MS (neg. Modus):	m/z 865 [M-H] <sup>-</sup> , 739, 713, 695, 577, 543, 451, 425, 407, 289, 245



<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>, 240 K, ppm): 2,71 (dd, 1H, J = <1 Hz, J = 16,4 Hz, H4Bu), 2,90 (dd, 1H, J = 4,3 Hz, J = 16,4 Hz, H4Au), 4,03 (m, 1H, H3o), 4,09 (m, 1H, H3m), 4,24-4,37 (3OH, OH3o, OH3u, OH3m), 4,36 (m, 1H, H3u), 4,80 (d, 2H, J = 8,8 Hz, H4o, H4m), 5,07 (s<sub>br</sub>, 2H, H2o, H2u), 5,20 (s<sub>br</sub>, 1H, H2m), 5,94 (s, 2H, H6m, H6u), 6,01 (d, 2H, J = 1,9 Hz, H6o, H8o), 6,61 (dd, 1H, J = <1 Hz, J = 8,5 Hz, H6'o), 6,65 (d, 1H, J = 8,3 Hz, H5'm), 6,70 (d, 1H, J = 8,2 Hz, H5'o), 6,71 (d, 1H, J = 8,1 Hz, H5'u), 6,93 (dd, 1H, J = 1,4 Hz, J = 8,3 Hz, H6'u), 6,95 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H2'o), 7,08 (d, 1H, J = 1,3 Hz, H5'm), 7,18 (d, 1H, J = 1,5 Hz, H2'u)

**(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →6-(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin**

Herkunft:	<i>Tilia tomentosa flos</i>
Summenformel:	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>
Molekülmasse:	866,77 g/mol
UV ( $\lambda_{\max}$ ):	230 und 280 nm
ESI-MS (neg. Modus):	m/z 865 [M-H] <sup>-</sup> , 739, 713, 695, 577, 543, 451, 425, 407, 289, 245



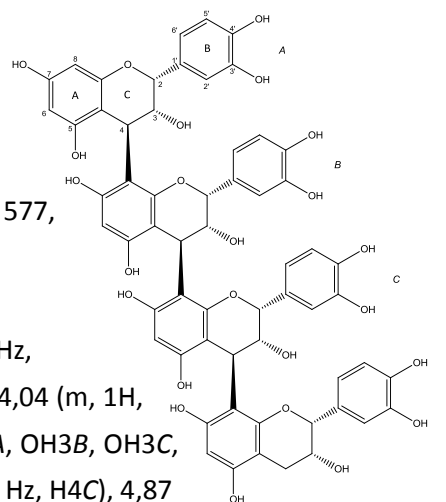
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>, 240 K, ppm): 2,62 (dd, 1H, J = <1 Hz, J = 16,6 Hz, H4Bu), 2,82 (dd, 1H, J = 4,7 Hz, J = 16,6 Hz, H4Au), 3,83 (m, 1H, H3o), 3,89 (m, 1H, H3m), 3,91 (1OH, OH3u), 4,25 (m, 1H, H3u), 4,32 (m, 1OH, OH3m), 4,47 (m, 1OH, OH3o), 4,54 (s<sub>br</sub>, 1H, H4m), 4,62 (s<sub>br</sub>, 1H, H4o), 4,83 (s<sub>br</sub>, 1H, H2o), 4,90 (s<sub>br</sub>, 1H, H2m), 4,91 (s<sub>br</sub>, 1H, H2u), 5,92 (s, 1H, H8m), 5,95 (d, 1H, J = 2,2 Hz, H6o), 6,08 (d, 1H, J = 2,2 Hz, H8o), 6,12 (s, 1H, H6u), 6,61 (d, 1H, J = 8,1 Hz, H5'u), 6,65 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H6'm), 6,70 (d, 1H, J = 8,1 Hz, H5'm), 6,72 (d, 1H, J = 8,1 Hz, H5'o), 6,80 (d, 1H, J = 8,3 Hz, H6'u), 6,99 (d, 1H, J = 1,7 Hz, H2'm), 7,00 (s, 1H, H2'o), 7,04 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H2'u)

**(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin-4 $\beta$ →8-(-)-Epicatechin**Herkunft: *Tilia tomentosa flos*Summenformel:  $C_{60}H_{50}O_{24}$ 

Molekülmasse: 1154,02 g/mol

UV ( $\lambda_{\max}$ ): 230 und 280 nmESI-MS (neg. Modus):  $m/z$  1153[M-H]<sup>-</sup>, 1027, 865, 739, 577, 451, 425, 407, 289, 245

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>, 240 K, ppm): 2,72 (dd, 1H, J = <1 Hz, J = 15,9 Hz, H4bD), 2,91 (dd, 1H, J = 3,96 Hz, J = 16,6 Hz, H4aD), 4,04 (m, 1H, H3A), 4,11 (m, 1H, H3C), 4,16 (m, 1H, H3B), 4,30 (m, 4OH, OH3A, OH3B, OH3C, OH3D), 4,39 (m, 1H, H3D), 4,80 (s<sub>br</sub>, 1H, H4A), 4,83 (d, 1H, J = < 1 Hz, H4C), 4,87 (s<sub>br</sub>, 1H, H4B), 5,08 (d, J = 4,1 Hz, 2H, H2A, H2D), 5,24 (s<sub>br</sub>, 1H, H2B), 5,26 (s<sub>br</sub>, 1H, H2C), 5,94 (s, 3H, H6B, H6C, H6D), 5,99 (d, 1H, J = 2,0 Hz, H8A), 6,01 (s<sub>br</sub>, 1H, H6A), 6,62 (dd, 1H, J = 1,3 Hz, J = 8,4 Hz, H6'A), 6,67 (m, 2H, H6'B, H'5C), 6,70 (d, 1H, n.b., H5'A), 6,72 (d, 1H, n.b., H5'B), 6,74 (m, 1H, H6'C), 6,92-6,94 (m, 3H, H6'D, H5'D, H2'A), 7,08 (d, 1H, J = n. b., H2'B), 7,12 (d, 1H, n.b., H2'C), 7,19 (d, 1H, J = 1,6 Hz, H2'D).



## 6 Literaturverzeichnis

- Arts, I. C. W.; van de Putte, B.; Hollman, P.C.H. (2000a): Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. Part 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods, *J. Agric. Food Chem.* 48 (5), 1746-1751.
- Arts, I. C. W.; van de Putte, B.; Hollman, P.C.H. (2000b): Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. Part 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk, *J. Agric. Food Chem.* 48 (5), 1752-1757.
- Azuma, K.; Ippoushi, K.; Nakayama, M.; Ito, H.; Higashio, H.; Terao, J. (2000): Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration, *J. Agric. Food Chem.* 48 (11), 5496-5500.
- Baba, S.; Furuta, T.; Horie, M.; Nakagawa, H. (1981): Studies on drug metabolism by use of isotopes XXVI: Determination of urinary metabolites of rutin in humans, *J. Pharmacol. Sci.* 70, 780-782.
- Böhm, H.; Boeing, H.; Hempel, J.; Raab, B.; Kroke, A. (1998): Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen, *Z. Ernährungswiss.*, 37, 147-163.
- Bolli, R. (2003): Sambucus Holunder, *Phytotherapie* 4,  
(<http://phyto.astral.ch/Phyto/ALL/phytotherapie/004-2003/10-sambucus.pdf>)
- Borzan, Z. (2001): silver linden, *Tilia tomentosa*,  
(<http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1379043>)
- Boyle, S. P.; Dobson, V. L.; Duthie, S. J.; Hinselwood, D. C.; Kyle, J. A. M.; Collins, A. R. (2000): Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: a human supplementation study, *Eur. J. Clin. Nutr.* 54 (10), 774-782.
- Boulton, D.W.; Walle, U.K.; Walle, T. (1998): Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *J. Pharm. Pharmacol.* 50 (2), 243-249.
- Breiter, T. (2012): Untersuchung zur Bioverfügbarkeit von Flavonoiden aus Rooibos- und Holunderblütentee in Plasma und Urin unter einmaliger Verabreichung, Dissertation, Leibniz-Universität Hannover.
- Chari, V. M.; Jordan, M.; Wagner, H. (1978): Structure elucidation and synthesis of naturally occurring acylglycosides. II. Structures of tiliroside, tribuloside, and ipomine, *Planta Med.* 34, 93-96.
- Christensen, P.L.; Kaack, K; Fretté, X.C. (2008): Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of elderflower extracts rich in flavonoids and phenolic acids, *Eur Food Res Technol* 227, 293-305.



- Clarkson, C.; Hansen, S. H.; Jaroszewski, J. W. (2005): Hyphenation of Solid-Phase Extraction with Liquid Chromatography and Nuclear Magnetic Resonance: Application of HPLC-DAD-SPE-NMR to Identification of Constituents of *Kanahia laniflora*, *Analytical Chemistry* 77 (11), 3547-3553.
- Clifford, M.N. (1999): Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden, *J. Sci. Food Agric.*, 79 (3), 362-372.
- Clifford, M. N.; Johnston, K. L.; Knight, S.; Kuhnert, N. (2003): Hierarchical Scheme for LC-MS<sup>n</sup> Identification of Chlorogenic Acids. *J. Agric. Food Chem.* 51 (10), 2900-2911.
- Clifford, M. N. (2004): Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health, *Planta Med.* 70 (12), 1103-1114.
- Conquer, J. A.; Maiani, G.; Azzini, E.; Raguzzini, A.; Holub, B. â. J. (1998): Supplementation with Quercetin Markedly Increases Plasma Quercetin Concentration without Effect on Selected Risk Factors for Heart Disease in Healthy Subjects, *J. Nutr.* 128 (3), 593-597.
- Conway, W.D. (1990): Countercurrent chromatography: apparatus, theory and applications, New York: VCH publishers.
- Conway, W.D. (1991): Counter-current chromatography, *J. Chromatogr.* 538 (1), 27-35.
- Cremin, P.; Kasim-Karakas, S.; Waterhouse, A. L. (2001): LC/ES-MS Detection of Hydroxycinnamates in Human Plasma and Urine, *J. Agric. Food Chem.* 49 (4), 1747-1750.
- Dangles, O.; Dufour, C.; Manach, C.; Morand, C.; Remesy, C. (2001): Binding of flavonoids to plasma proteins, *Methods Enzymol.* 335, 319-333.
- Dávalos, A.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. (2004): Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay, *J. Agric. Food Chem.* 52, 48-54.
- Day, A. J.; Mellon, F.; Barron, D.; Sarrazin, G.; Morgan, M. R. A.; Williamson, G. (2001): Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin, *Free Radicals Res.* 35 (6), 941-952.
- Day, A. J.; Williamson, G. (2001): Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma, *Br. J. Nutr.* 86 (1), 105-110.
- DIN 32645 (2008): Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen, Berlin: Beuth Verlag.
- De Keukeleire, D., De Cooman, L., Rong, H., Heyerick, A., Kalita, J., Milligan, S.R. (1999): Functional properties of hop polyphenols. *Basic Life Sci.* 66, 739-760.
- Del Rio, D. S. A.; Calani, L.; Corzier, A. (2010): Bioavailability of Coffee Chlorogenic Acids and Green Tea Flavan-3-ols, *Nutrition* 2, 820-833.

- Duenas, M. S.-L.; Gonzalez-Manzano, F.; Gonzalez-Paramas, S.; Santos-Buelga, C. (2010): Antioxidant properties of major metabolites of quercetin, *Eur. Food Res. Technol.* 232, 103-111.
- Eisenbrand, G. und Schreier, P. (2006): Römpp Lexikon Lebensmittelchemie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Engelhardt, U. H. (1998): Polyphenole in Tee, W.I.T. – *Wissenschaftlicher Informationsdienst Tee*, Deutsches Tee-Institut, Hamburg.
- Esatbeyoglu, T. (2011): Analyse wertgebender Inhaltsstoffe von *Aronia melanocarpa*, sowie Charakterisierung und Isolierung von Proanthocyanidinen, Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Göttingen: Cuvillier.
- Fabre, N.; Rustan, I.; De Hoffmann, E.; Quetin-Leclercq, J. (2001): Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12 (6), 707-715.
- Franzke, C. (1996): Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Behr's Verlag, Hamburg.
- Gonthier, M.-P.; Verny, M.-A.; Besson, C.; Révész, C.; Scalbert, A. (2003): Chlorogenic Acid Bioavailability Largely Depends on Its Metabolism by the Gut Microflora in Rats, *J. Nutr.* 133 (6), 1853-1859.
- Graefe, E.U. (2000): Relative Systemische Verfügbarkeit und Pharmakokinetik von Quercetin und Quercetinglykosiden (Quercetin-4'-O-glucosid und Quercetin-3-O-rhamnoglucosid) im Menschen, Dissertation, Julius-Maximilian-Universität Würzburg.
- Graefe, E. U.; Wittig, J.; Mueller, S.; Riethling, A.-K.; Uehleke, B.; Drewelow, B.; Pforte, H.; Jacobasch, G.; Derendorf, H.; Veit, M. (2001): Pharmacokinetics and bioavailability of Quercetin glycosides in humans, *Eur. J. Clin. Pharm.* 41 (5), 492-499.
- Gross, M.; Pfeiffer, M.; Martini, M.; Campbell, D.; Slavin, J.; Potter, J. (1996): The quantitation of metabolites of quercetin flavonols in human urine, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5 (9), 711-720.
- Gu, L.; Kelm, M.A.; Hammerstone, J. F.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Prior, R. L. (2003): Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation, *J. Agric. Food Chem.* 51 (25), 7513-7521.
- Gugler, R.; Leschik, M.; Dengler, H. J. (1975): Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses, *Eur. J. Clin. Pharm.* 9, 229-234.
- Hemingway, R. W.; Foo, L. Y.; Porter, L. J. (1982): Linkage isomerism in trimeric and polymeric 2,3-cis-procyanidins, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, 1209-1216.
- Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. (1995): Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Hilal, Y. (2010): Untersuchungen über Polyphenole in weißen und grünen Tees, Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Göttingen: Cuvillier.

- Hillebrand, S. (2004): Analytik von Polyphenolen in Buntsäften im Hinblick auf Saftqualität, Farbe und antioxidative Aktivität, Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Göttingen: Cuvillier.
- Hollman, P. C.; Vries, J. H. d.; Leeuwen, S. D.; Mengelers, M. J.; Katan, M. B. (1995): Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers, *Am. J. Clin. Nutr.* 62 (6), 1276-82.
- Hollman, P. C. H. (2004): Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids, *J. Pharm. Biol. (Lisse, Neth.)* 42, 74-83.
- ISO 14502-1 (2005): Determination of substances characteristic of green and black tea Part 1: Content of total polyphenols in tea. Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent.
- Ito, Y.; Weinstein, M.; Aoki, I.; Harada, R.; Kimura, E.; Nunogaki, K. (1966): Coil planet centrifuge, *Nature* (London, U.K.) 212 (5066), 985-987.
- Ito, Y. (1992): Speculation on the mechanism of unilateral hydrodynamic distribution of two immiscible solvent phases in the rotating coil, *J. Liq. Chromatogr.* 15 (15-16), 2639-2675.
- Ito, Y.; Yang, F.; Fitze, P.; Powell, J.; Ide, D. (2003): Improved spiral disk assembly for high-speed countercurrent chromatography, *J. Chromatogr., A* 1017 (1-2), 71-81.
- Ito, H.; Gonthier, M.-P.; Manach, C.; Morand, C.; Mennen, L.; Remesy, C.; Scalbert, A. (2005): Polyphenol levels in human urine after intake of six different polyphenol-rich beverages, *Br. J. Nutr.* 94 (4), 500-509.
- Kahle, K. (2008): Polyphenole aus Apfelsaft: Studien zur Verfügbarkeit im Humanstoffwechsel, Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Kennedy, J. A.; Jones, G.P. (2001): Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol, *J. Agric. Food Chem.* 49 (4), 1740-1746.
- Knust, U. E. G.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H.; Owen, R.W. (2006): Identification and quantitation of phenolic compounds in faecal matrix by capillary gas chromatography and nano-electrospray mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 3119-3129.
- Köhler, N. (2006): Entwicklung und Anwendung leistungsfähiger präparativer gegenstromverteilungschromatographischer Trenntechniken, Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Göttingen: Cuvillier.
- Köhler, N.; Wray, V.; Winterhalter, P. (2008): Preparative isolation of procyanidins from grape seed extracts by high-speed counter-current chromatography, *J. Chromatogr., A* 1177 (1), 114-125.
- Kuhnle, G.; Spencer, J. P. E.; Schroeter, H.; Shenoy, B.; Debnam, E. S.; Srai, S. K. S.; Rice-Evans, C.; Hahn, U. (2000): Epicatechin and Catechin are O-Methylated and Glucuronidated in the Small Intestine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277 (2), 507-512.
- Lakenbrink, C.; Lapczynski, S.; Maiwald, B.; Engelhardt, U.H. (2000): Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages, *J. Agric. Food Chem.* 48, 2848-2852.

- Langhammer, L.; Rauwald, H.-W.; Schulze, G. (1981): Neu-Untersuchung von Tiliae flos DAB 8, *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 314, 424-432.
- Lapczynski, S. (2000): Quantitative Untersuchungen von Theaflavinen und Flavanolen in grünen und schwarzen Tees, Dissertation, TU Braunschweig.
- Lee, M. J.; Wang, Z. Y.; Li, H.; Chen, L.; Sun, Y.; Gobbo, S.; Balentine, D. A.; Yang, C. S. (1995): Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 4, 393-399.
- Lindmann, C. A. M. (1926): Bilder ur Nordens Flora, (<http://runeberg.org/nordflor/>).
- Macheix, J. J.; Fleuriet, A.; Billot, J. (1990): Fruit phenolics. *CRC Press*, Boca Raton.
- Manach, C.; Morand, C.; Demigne, C.; Texier, O.; Regerat, F.; Remesy, C. (1997): Bioavailability of rutin and quercetin in rats, *FEBS Lett.* 409 (1), 12-16.
- Manach, C.; Morand, C.; Crespy, V.; Demigne, C.; Texier, O.; Regerat, F.; Remesy, C. (1998): Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties, *FEBS Lett.* 426 (3), 331-336.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. (2004): Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (5): 727-747.
- Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Remesy, C. (2005): Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies, *Am J Clin Nutr.* 81 (1), 230S-242S.
- Matsuda, H.; Ninomiya, K.; Shimoda, H.; Yoshikawa, M. (2002): Hepatoprotective Principles from the Flowers of Tilia argentea (Linden): Structure Requirements of Tiliroside and Mechanisms of Action, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10, 707-712.
- Matthews, S.; Mila, I.; Scalbert, A.; Pollet, B.; Lapiere, C.; Hervé du Penhoat, C. L. M.; Rolando, C.; Donnelly, D. M. X. (1997): Method for estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles, *J. Agric. Food Chem.* 45 (4), 1195-1201.
- Mazza, G.; Miniati, E. (1993): Anthocyanins in Fruit, Vegetables and Grains. *CRC Press*, Boca Raton.
- Mc Murrough, I.; Hennigan, G. P.; Loughrey, M. (1982): Quantitative Analysis of Hop Flavonols Using High-Performance Liquid Chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 30 (6), 1102-1106.
- Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. (1993): A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin. Sci.* 84 (4), 407-412.
- Monteiro, M.; Farah, A.; Perrone, D.; Trugo, L. C.; Donangelo, C. (2007): Chlorogenic Acid Compounds from Coffee Are Differentially Absorbed and Metabolized in Humans, *J. Nutr.* 137 (10), 2196-2201.

- Moon, J.-H. N., R.; Oshima, S; Inakuma, T; Terao, J. (2000): Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women, *Am. J. Physiol.* 279, 461-467.
- Moridani, M. Y.; Scobie, H.; O'Brien, P. J. (2002): Metabolism of caffeic acid by isolated rat hepatocytes and subcellular fractions, *Toxicol. Lett.* 133 (2-3), 141-151.
- Mullen, W.; Boitier, A.; Stewart, A. J.; Crozier, A. (2004): Flavonoid metabolites in human plasma and urine after the consumption of red onions: analysis by liquid chromatography with photodiode array and full scan tandem mass spectrometric detection, *J. Chromatogr., A.* 1058 (1-2), 163-168.
- Mullen, W.; Edwards, C. A.; Crozier, A. (2006): Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions, *Br. J. Nutr.* 96, 107-116.
- Muselik, J.; Garcia-Alonso, M.; Martin-Lopez, M.; Žemlička, M.; Rivas-Gonzalo, J. (2007): Measurement of Antioxidant Activity of Wine Catechins, Procyanidins, Anthocyanins and Pyranoanthocyanins, *International Journal of Molecular Sciences.* 8 (8), 797-809.
- Nielsen, S. E.; Freese, R.; Kleemola, P.; Mutanen, M. (2002): Flavonoids in human urine as biomarkers for intake of fruits and vegetables, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11 (5), 459-466.
- Oliveira, E.J.; Watson, D.G. (2000): In vitro glucuronidation of kaempferol and quercetin by human UGT-1 microsomes, *FEBS Lett.* 471, 1-6.
- Oliveira, E.J.; Watson, D.G.; Grant, M.H. (2002): Metabolism of quercetin and kaempferol by rat hepatocytes and the identification of flavonoid glycosides in human plasma, *Xenobiotica* 32, 279-287.
- Olthof, M. R.; Hollman, P. C. H.; Buijsman, M. N. C. P.; van Amelsvoort, J. M. M.; Katan, M. B. (2003): Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans, *J. Nutr.* 133 (6), 1806-1814.
- Paganga, G.; Rice-Evans, C. A. (1997): The identification of flavonoids as glycosides in human plasma, *FEBS Lett.* 401 (1), 78-82.
- Pokorny, O. (2005): Antioxidativ wirksame Verbindungen in Brombeerblättern, Cistus incanus, Himbeerblättern, Pfefferminze und anderen Kräuter- und Früchtetees, Dissertation, Technische Universität Braunschweig, ([http://rzbl04.biblio.etc.tu-bs.de:8080/docportal/servlets/MCRFileNodeServlet/DocPortal\\_derivate\\_00001794/DocumeDo.pdf](http://rzbl04.biblio.etc.tu-bs.de:8080/docportal/servlets/MCRFileNodeServlet/DocPortal_derivate_00001794/DocumeDo.pdf) , zuletzt besucht am 05.05.2011)
- Porter, L. J. (1989): Tannins, in: *Methods in plant biochemistry*, Vol. 1 Plant Phenolics, 389-419.
- Porter, L. J.; Hrstich, L. N.; Chan, B.G. (1985): The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin, *Phytochemistry* 25, 223-230.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (9-10), 1231-1237.

- Rechner, A. R.; Spencer, J. P. E.; Kuhnle, G.; Hahn, U.; Rice-Evans, C. A. (2001): Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo, *Free Radical Biol. Med.* 30 (11), 1213-1222.
- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. (1996): Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (7), 933-956.
- Roura, E.; Andres-Lacueva, C.; Jauregui, O.; Badia, E.; Estruch, R.; Izquierdo-Pulido, M.; Lamuela-Raventos, R. M. (2005): Rapid liquid chromatography tandem mass spectrometry assay to quantify plasma (-)-epicatechin metabolites after ingestion of a standard portion of cocoa beverage in humans, *J. Agric. Food Chem.* 53 (16), 6190-6194.
- Rücker, G.; Neugebauer, G.; Willems, G. (2008): Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 4. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Sägesser, M.; Deinzer, M. (1996): HPLC-ion spray-tandem mass spectrometry of flavonol glycosides in hops, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 54, 129.
- Sauter, W. (2004): Vergleich antioxidativer Eigenschaften von Extrakten aus *Camellia sinensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Cyclopia genistoides*, *Cyclopia sessiliflora* und *Aspalathus linearis*, Dissertation, Technische Universität München.
- Scalbert, A.; Williamson, G. (2000): Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols, *J. Nutr.* 130 (8S), 2073S-2085S.
- Schilcher, H.; Hagels, H. (1996): Zur Pharmakokinetik und zum Metabolismus von Flavonoiden. In: Loew, D., Rietbrock, N. (eds) *Phytopharmaka II: Forschung und klinische Anwendung*, Steinkopff Verlag Darmstadt, 55-62.
- Schoenfeldt, S. (2010): Qualifizierung, Quantifizierung und Isolierung von Polyphenolen aus *Tiliae tomentosae flos* (Silberlindenblüten), Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Technische Universität Braunschweig.
- Segawa, S.; Yasui, K.; Takata, Y.; Kurihara, T.; Kaneda, H.; Watari, T. (2006): Flavonoid Glycosides Extracted from Hop (*Humulus lupulus* L.) as Inhibitors of Chemical Mediator release from Human Basophilic KU812 cells, *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 70 (12), 2990-2997.
- Singleton, V.L., Rossi, J. A. (1965): Colorimetry of total phenolics with phospho-molybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Viticult.*, 16 (3), 144-158.
- Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. (1999): Analysis of total phenolics and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology, Oxidants and Antioxidants, Part A*, Academic Press, San Diego, 152-178.
- Spencer, J.P.; Chowrimootoo, G.; Choudhury, R.; Debnam, E. S.; Srai, S. K.; Rice-Evans, C. (1999): The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids, *FEBS Lett.* 458, 224-230.
- Stalmach, A.; Mullen, W.; Barron, D.; Uchida, K.; Yokota, T.; Cavin, C.; Steiling, H.; Williamson, G.; Crozier, A. (2009): Metabolite Profiling of Hydroxycinnamate Derivatives in Plasma and Urine after the Ingestion of Coffee by Humans: Identification of Biomarkers of Coffee Consumption, *Drug Metab. Dispos.* 37 (8), 1749-1758.

- Stoll, S. (2008): Bioaktive Naturstoffe aus chinesischen Getreide- und Gemüsearten, Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Göttingen: Cuvillier.
- Sutherland, I. (1987): Countercurrent chromatography, *Lab. Pract.* 36 (2), 37-42.
- Toker, G., Aslan, M., Yesilada, E., Memisoglu, M., Ito, S. (2001): Comparative evaluation of the flavonoid content in officinal *Tiliae flos* and Turkish lime species for quality assessment, *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 26, 111-121.
- van Amelsvoort, J. M. M.; Van Het Hof, K. H.; Mathot, J. N. J. J.; Mulder, T. P. J.; Wiersma, A.; Tijburg, L. B. M. (2001): Plasma concentrations of individual tea catechins after a single oral dose in humans, *Xenobiotica*. 31 (12), 891-901.
- Walle, T.; Otake, Y.; Brubaker, J.A.; Walle, U.K.; Halushka, P.V. (2001): Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 51 (2), 143-146.
- Watzl, B.; Rechkammer, G. (2001): Flavonoide, *Ernährungs-Umschau*. 48, 499-503.
- Wiese, S. (2010): Biokinetik und biologische Aktivität von Flavan-3-olen, Dissertation, Universität Potsdam.
- Wirtschaftsvereinigung Kräuter- und Fruchttée e. V. (2010): Wirtschaftsdaten und Veröffentlichungen (Basismappe), (<http://www.wkf.de>, zuletzt besucht am 01.04.2011).
- Wittemer, S. M. M. (2003): Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik von Caffeoylchinasäuren und Flavonoiden nach oraler Applikation von Artischockenblätter-Extrakt am Menschen, Dissertation, Universität Bonn.
- World Health Organization (WHO) (2002): Flos Sambuci in: Monographs on selected Medicinal Plants. *World Health Organization* 2, Geneva, 269-275.
- Yamanishi, T. (1990): Bitter Compounds in Tea, *Bitterness in Foods and Beverages, Series: Development in Food Science* 25, 159-167.
- Zimmermann, B.F.; Papagiannopoulos, M.; Brachmann, S.; Lorenz, M.; Stangl, V.; Galensa, R.: A shortcut from plasma to chromatographic analysis: Straightforward and fast sample preparation for analysis of green tea catechins in human plasma, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (8-9), 823-826.
- Zub, M. R. (1970): Flavonoids in *Tilia platyphyllos* and *T. cordata*, *Rast. Resur.* 6, 400-404.

## 7 Anhang

### 7.1 HSCCC-Trennungen

#### 7.1.1 Hol CCC-1

Probe:	XAD-7 Holunderblütenextrakt
Fließmittel:	<i>tert</i> -Butylmethylether/Methanol/Wasser/Butanol (6/1,5/5/3,5; v/v/v/v)
Flussrate:	4 mL/min
Rotationsgeschwindigkeit:	800 U/min
Detektionswellenlänge:	354 nm
Modus:	head to tail

#### 7.1.2 Hol CCC-2

Probe:	methanolischer Holunderblütenextrakt
Fließmittel:	Ethylacetat/Butanol/Wasser (4,2; 0,8; 5; v/v/v)
Flussrate:	3,5 mL/min
Rotationsgeschwindigkeit:	800 U/min
Detektionswellenlänge:	354 nm
Modus:	head to tail

#### 7.1.3 Hol CCC-3

Probe:	methanolischer Holunderblütenextrakt
Fließmittel:	Ethylacetat/Butanol/Wasser (4,2; 0,8; 5; v/v/v)
Flussrate:	4 mL/min
Rotationsgeschwindigkeit:	800 U/min
Detektionswellenlänge:	354 nm
Modus:	tail to head

#### 7.1.4 Silb CCC-1

Probe:	ethanolischer Ethylacetatextrakt aus Silberlindenblüten
Fließmittel:	<i>tert</i> -Butylmethylether/Acetonitril/Wasser (5/3/6; v/v/v)
Flussrate:	4 mL/min
Rotationsgeschwindigkeit:	800 U/min
Detektionswellenlänge:	280 nm
Modus:	head to tail



### 7.1.5 Silb CCC-2

Probe:	methanolischer Ethylacetatextrakt aus Silberlindenblüten
Fließmittel:	n-Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser (1/5/1/5; v/v/v/v)
Flussrate:	4 mL/min
Rotationsgeschwindigkeit:	800 U/min
Detektionswellenlänge:	354 nm
Modus:	head to tail

### 7.1.6 Silb CCC-3

Probe:	Fraktion 1 der „Silb Spiral-Coil“
Fließmittel:	Ethylacetat/Butanol/Wasser (14/1/15; v/v/v)
Flussrate:	4 mL/min
Rotationsgeschwindigkeit:	800 U/min
Detektionswellenlänge:	280 nm
Modus:	head to tail

## 7.2 Spiral-Coil LSRCCC Trennung

### 7.2.1 Silb Spiral-Coil

Probe:	methanolischer und ethanolischer Ethylacetatextrakt aus Silberlindenblüten
Fließmittel:	<i>tert</i> -Butylmethylether/Acetonitril/Wasser (5/3/6; v/v/v)
Flussrate:	5 mL/min
Rotationsgeschwindigkeit:	132 U/min
Detektionswellenlänge:	354 nm

## 7.3 Plasmascreening

### 7.3.1 Chinasäure

	Teeaufguss					isolierte Fraktion				
t [h]	c <sub>MW</sub>	SD	c <sub>max</sub>	c <sub>min</sub>	Pb>0	c <sub>MW</sub>	SD	c <sub>max</sub>	c <sub>min</sub>	Pb>0
0	0	0	0	0	0	4,85	8,23	24,60	4,79	3
0,5	0	0	0	0	0	10,23	-	-	-	-
1,5	0,04	0,12	0,35	0	1	19,91	34,96	113,94	3,94	5
3	0	0	0	0	0	32,19	42,71	136,75	1,37	6
8	15,66	10,99	35,78	0	7	48,91	46,89	130,08	5,65	6

### 7.3.2 Dihydroferulasäure

	Teeaufguss					isolierte Fraktion				
t [h]	c <sub>MW</sub>	SD	c <sub>max</sub>	c <sub>min</sub>	Pb>0	c <sub>MW</sub>	SD	c <sub>max</sub>	c <sub>min</sub>	Pb>0
0	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
0,5	0,40	0,63	1,61	0	3	0	-	-	-	-
1,5	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
3	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
8	0,019	-	0,29	0	1	0	-	-	-	-

### 7.3.3 Homovanillinsäure

	Teeaufguss					isolierte Fraktion				
t [h]	c <sub>MW</sub>	SD	c <sub>max</sub>	c <sub>min</sub>	Pb>0	c <sub>MW</sub>	SD	c <sub>max</sub>	c <sub>min</sub>	Pb>0
0	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
0,5	42,40	50,10	134,48	0	4	0	-	-	-	-
1,5	0,45	-	4,03	0	1	0	-	-	-	-
3	0,40	-	3,59	0	1	0	-	-	-	-
8	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

### 7.3.4 Quercetinsulfat

	Teeaufguss					isolierte Fraktion				
t [h]	c <sub>MW</sub>	SD	c <sub>max</sub>	c <sub>min</sub>	Pb>0	c <sub>MW</sub>	SD	c <sub>max</sub>	c <sub>min</sub>	Pb>0
0	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
0,5	0,023	-	0,20	0	1	0	-	-	-	-
1,5	0,022	-	0,20	0	1	0	-	-	-	-
3	0,0095	-	0,08	0	1	0	-	-	-	-
8	0,14	0,17	0,52	0	5	0	-	-	-	-



**7.4.4 Homovanillinsäure**

	Teeaufguss					isolierte Fraktion				
t [h]	C <sub>MW</sub>	SD	C <sub>max</sub>	C <sub>min</sub>	Pb>0	C <sub>MW</sub>	SD	C <sub>max</sub>	C <sub>min</sub>	Pb>0
0	0	-	-	-	-	0,99	-	8,94	0	1
2	15,84	-	142,60	0	1	18,39	31,21	64,65	0	4
4	100,22	229,09	730,26	0	2	8,01	20,45	65,58	0	2
8-24	0,88	-	7,96	0	1	47,16	88,23	214,91	0	2

**7.4.5 Homovanillinsäuresulfat**

	Teeaufguss					isolierte Fraktion				
t [h]	C <sub>MW</sub>	SD	C <sub>max</sub>	C <sub>min</sub>	Pb>0	C <sub>MW</sub>	SD	C <sub>max</sub>	C <sub>min</sub>	Pb>0
0	542,60	811,71	1481,94	0	3	79,28	160,06	484,40	0	2
2	515,85	1081,03	3469,23	0	4	86,28	222,78	713,98	0	2
4	3107,61	4173,15	12734,88	0	5	14,52	27,45	73,67	0	2
8-24	3476,88	4258,78	13248,41	0	6	527,84	801,78	2305,53	0	4

**7.4.6 5-Kaffeoylchinasäure**

	Teeaufguss					isolierte Fraktion				
t [h]	C <sub>MW</sub>	SD	C <sub>max</sub>	C <sub>min</sub>	Pb >0	C <sub>MW</sub>	SD	C <sub>max</sub>	C <sub>min</sub>	Pb >0
0	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
2	2,25	3,29	8,90	0	3	0	-	-	-	-
4	4,56	6,39	17,99	0	4	0	-	-	-	-
8-24	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

**7.4.7 5-Feruloylchinasäure**

	Teeaufguss					isolierte Fraktion				
t [h]	C <sub>MW</sub>	SD	C <sub>max</sub>	C <sub>min</sub>	Pb >0	C <sub>MW</sub>	SD	C <sub>max</sub>	C <sub>min</sub>	Pb >0
0	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
2	2,85	4,53	10,98	0	4	0,78	2,02	6,31	0	2
4	11,58	17,98	58,35	0,07	9	0,83	1,63	5,03	0	3
8-24	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-